

# Validação de Métodos Químicos

Rita Adriana da Costa

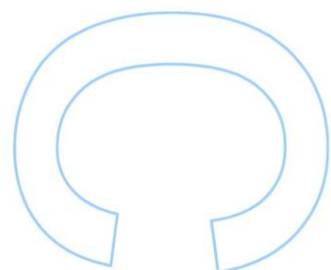
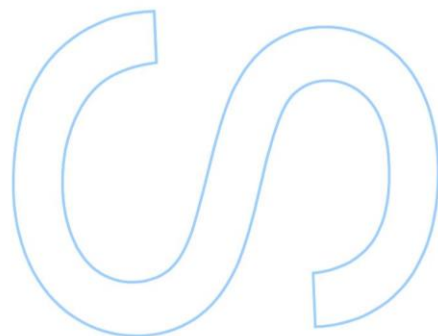
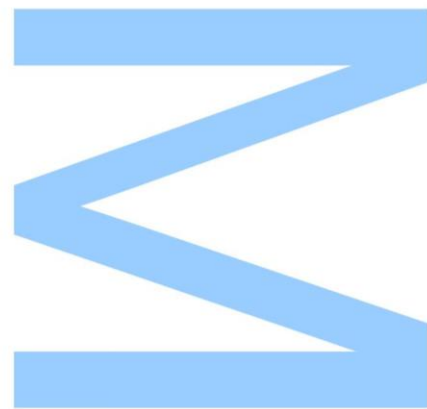
Mestrado em Bioquímica  
Departamento Química e Bioquímica  
2017

**Orientador (Faculdade)**

Luís Guido, Professor Auxiliar,  
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

**Orientador (Empresa)**

Alice Santos, Responsável Laboratório Físico-Química,  
*Silliker* Portugal S.A.

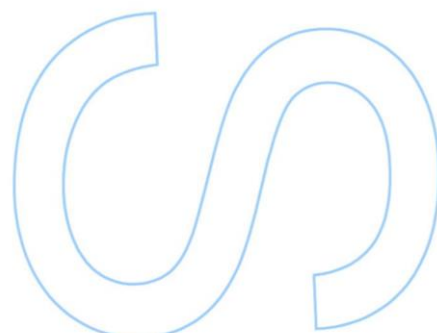
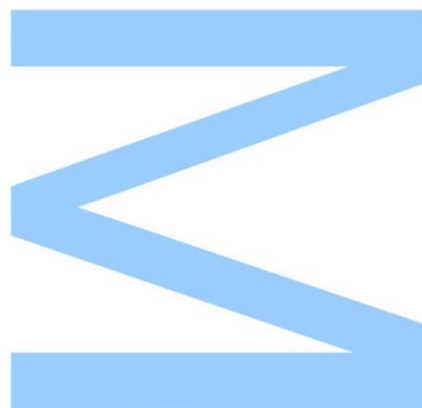




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



# Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o contributo de várias pessoas às quais não posso deixar de demonstrar o meu apreço e gratidão.

Desejo expressar os meus mais sinceros agradecimentos à Dr<sup>a</sup> Alice pela orientação e disponibilidade demonstrada.

Agradeço ao Professor Luís Guido, meu orientador de estágio, pelo incentivo, pela utilidade das recomendações, e pela disponibilidade ao longo deste estágio.

Agradeço à Siliker e todos os seus colaboradores por me receberem, acolherem, auxiliarem e pelo profissionalismo durante o período de estágio.

À equipa do laboratório de química obrigada pelos conselhos, pela atenção e paciência que sempre demonstraram, e sobretudo pelo bom ambiente de trabalho e boa disposição.

À minhas colegas, que são hoje minhas amigas, obrigada pela ajuda e companhia e por juntas termos concluído mais uma jornada. Não era o mesmo sem vocês.

À minha família, obrigada pelo carinho e pela força que me deram durante o crescimento ao longo desta etapa, e por estarem sempre presentes.

## Resumo

A preocupação com uma alimentação adequada é progressivamente mais relevante nos dias de hoje, devido à sua íntima relação com a saúde. O controlo das propriedades sensoriais, químicas, microbiológicas e físicas dos géneros alimentícios, assegura a qualidade, segurança alimentar e rastreabilidade dos alimentos de acordo com a legislação e as exigências dos consumidores.

A validação de métodos analíticos é um meio de garantir a qualidade analítica dos métodos de análise alimentares, esta tendo como objetivo assegurar o rigor dos resultados obtidos.

A Silliker Portugal, parte integrante da Mérieux NutriSciences, é uma empresa independente de prestação de serviços ao setor agroalimentar, líder mundial na melhoria da qualidade e segurança alimentar. A Silliker dedica-se a estabelecer, implementar e manter o sistema de gestão adequado, de forma a garantir a qualidade dos resultados dos ensaios, bem como a satisfação do cliente, oferecendo vários serviços, onde se inclui o serviço de análises químicas, microbiológicas e sensoriais, o serviço de consultadoria em segurança e qualidade alimentar, consultadoria em rotulagem de géneros alimentícios, auditorias e inspeções.

O presente trabalho foi elaborado no laboratório de química clássica da Silliker Portugal S.A. e teve como objetivo a validação de métodos analíticos nas técnicas de absorção molecular para a determinação do teor total de fósforo, em diversas matrizes alimentares, e do método de determinação de acidez por titulação para matrizes de produtos hortícolas e derivados.

Ambos os métodos analíticos foram validados. O método de determinação do teor total de fósforo, demonstrou uma repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis e apresentou resultados exatos. Das 20 matrizes analisadas para este método, 17 foram validadas, 1 foi excluída após análise estatística e 2 não foram consideradas devido a apresentarem um teor a baixo do limite de quantificação. O método de determinação da acidez apresentou de igual forma uma repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis, com resultados exatos. Neste método analisaram-se 8 matrizes e todas foram validadas.

Palavras-chave: Validação de métodos analíticos; Espectrofotometria de absorção molecular; Titulação.

# Abstract

The concern about an adequate alimentation is progressively more relevant today because of its intimate relationship with health. The control of sensory, chemical, microbiological and physical properties of foodstuffs ensures food quality, food safety and traceability in accordance with legislation and consumer requirements.

The validation of analytical methods is a means of guaranteeing the analytical quality of the methods of food analysis, in order to ensure the accuracy of the results obtained.

Silliker Portugal, an integral part of Mérieux NutriSciences, is an independent company providing services to the agri-food sector and world leader in quality improvement and food safety. Silliker is dedicated to establishing, implementing and maintaining the appropriate management system in order to guarantee the quality of test results as well as customer satisfaction by offering various services including the service of chemical, microbiological and sensory analysis, food safety and quality consultancy, food labelling advice, audits and inspections.

The present work was elaborated in the classic chemistry laboratory of Silliker Portugal S.A., its objective was the validation of analytical methods in the techniques of molecular absorption for the determination of the total content of phosphorus in several matrices and the method of determination of acidity by titration for matrices of vegetables and derivatives.

Both analytical methods were validated. The method for the determination of the total content of phosphorus demonstrated acceptable repeatability and intermediate precision and yielded accurate results. Of the 20 matrices analysed for this method, 17 were validated, 1 was excluded after statistical analysis and 2 were not considered due to their content being below the limit of quantification. The method of determination of acidity also showed acceptable repeatability and intermediate precision with exact results. In this method 8 matrices were analysed and all were validated.

Key-words: Validation of analytical methods; Molecular absorption spectrophotometry; Titration.

# Índice

Agradecimentos .....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas.....	8
Lista de Abreviaturas.....	10
1. Introdução .....	11
1.1. Silliker Portugal, SA.....	11
1.2. Objetivos do estágio.....	13
2. Validação de métodos.....	14
2.1. Avaliação indireta.....	15
2.1.1. Especificidade/Seletividade.....	15
2.1.2. Quantificação .....	16
2.1.3. Precisão.....	19
2.2. Avaliação direta.....	24
2.2.1. Materiais de referência certificados.....	24
2.2.2. Ensaio de comparação interlaboratorial.....	25
2.3. Incerteza do método.....	25
2.3.1. Incerteza padrão combinada .....	26
2.3.2. Incerteza expandida de medição.....	26
3. Determinação do teor de fósforo total.....	26
3.1. Fósforo.....	26
3.2. Espectrofotometria de absorção molecular .....	27
3.3. Lei de Lambert-Beer.....	29
3.4. Procedimento .....	30
3.4.1. Objetivo.....	30

3.4.2.	Resumo do processo.....	30
3.4.3.	Reagentes e soluções .....	30
3.4.4.	Aparelhos e utensílios .....	32
3.4.5.	Preparação de amostras .....	33
3.4.6.	Técnica.....	33
3.4.7.	Matrizes.....	35
4.	Determinação da acidez em géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas.....	36
4.1.	Acidez nos alimentos.....	36
4.2.	Procedimento .....	37
4.2.1.	Objetivo .....	37
4.2.2.	Definição .....	37
4.2.3.	Resumo do processo.....	37
4.2.4.	Reagentes e soluções .....	37
4.2.5.	Aparelhos e utensílios .....	37
4.2.6.	Preparação de amostras .....	38
4.2.7.	Técnica.....	39
4.2.8.	Matrizes.....	40
5.	Resultados e discussão.....	41
5.1.	Determinação Teor de Fósforo Total .....	41
5.1.1.	Precisão .....	41
5.1.2.	Exatidão .....	55
5.1.3.	Limite de quantificação .....	55
5.1.4.	Linearidade.....	56
5.1.5.	Gama de trabalho.....	56
5.1.6.	Incerteza.....	56
5.1.7.	Apresentação dos resultados .....	57
5.2.	Determinação de Acidez.....	57
5.2.1.	Precisão .....	57

5.2.2.	Exatidão .....	64
5.2.3.	Limite de quantificação.....	65
5.2.4.	Incerteza .....	65
5.2.5.	Apresentação dos resultados .....	66
6.	Conclusões .....	67
7.	Bibliografia .....	69
8.	Anexos .....	71
	Anexo A – Valores críticos para os testes de Cochran e Grubbs .....	71
	Anexo B – Cálculos e incertezas .....	73



# Índice de Figuras

Figura 1 – Instalações da Silliker Portugal, S. A.....	12
Figura 2 - Esquema representativo da divisão estrutural da Silliker Portugal. ....	13
Figura 3 – Estrutura do ião fosfato. ....	27
Figura 4 – Esquema representativo dos componentes de um espectrofotómetro para o UV/Vis. ....	28

# Índice de Tabelas

Tabela 1 – Fatores que influenciam a variabilidade e as suas condições .....	21
Tabela 2 – Reagentes utilizados. ....	31
Tabela 3 – Estudo da repetibilidade, para concentrações de fósforo menores que 0,50 g/100 g .....	42
Tabela 4 - Teste de Grubbs, para concentrações de fósforo menores que 0,50 g/ 100g .	43
Tabela 5 – Teste de Grubbs para a matriz chocolate com frutos secos, após remoção de “outlier” .....	43
Tabela 6 – Teste de Cochran, para concentrações de fósforo menores que 0,50 g/ 100g .....	44
Tabela 7 – Matriz eliminada após a realização do teste de Cochran .....	44
Tabela 8 - Estudo da repetibilidade, para concentrações de fósforo maiores que 0,50 g/ 100g .....	45
Tabela 9 – Teste de Grubbs para concentrações de fósforo maiores que 0,50 g/ 100g ..	46
Tabela 10 – Teste de Cochran para concentrações de fósforo maiores que 0,50 g/ 100g .....	46
Tabela 11 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz BIPEA - spread .....	47
Tabela 12 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz achocolatado .....	47
Tabela 13 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz BIPEA - dietary biscuit .....	48
Tabela 14 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz BIPEA - cereals .....	48
Tabela 15 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz BIPEA - dietary supplement .....	49
Tabela 16 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz feijão preto .....	49
Tabela 17 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz sementes de girassol .....	50
Tabela 18 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz farinha de trigo .....	50
Tabela 19 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz linhaça .....	51

Tabela 20 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz caju .51	51
Tabela 21 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz arroz51	51
Tabela 22 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz farinha não láctea.....52	52
Tabela 23 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz BIPEA - cordon bleu.....52	52
Tabela 24 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz BIPEA - ready-made dish with meat.....53	53
Tabela 25 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz amêndoa .....53	53
Tabela 26 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz chocolate com frutos secos.....54	54
Tabela 27 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz sementes de chia.....54	54
Tabela 28 – Parâmetros de precisão intermédia do método .....54	54
Tabela 29 - Avaliação da exatidão do método .....55	55
Tabela 30 – Componente da precisão intermédia para o cálculo de incerteza.....56	56
Tabela 31 – Valor de incerteza expandida estimada.....57	57
Tabela 32 – Parâmetros de repetibilidade para a acidez determinada em ml/100g. ....58	58
Tabela 33 – Teste de Grubbs para a determinação de acidez. ....59	59
Tabela 34 - Teste de Grubbs para a matriz limão, após remoção de “outlier”. ....59	59
Tabela 35 – Teste de Cochran para a determinação de acidez. ....60	60
Tabela 36 – Determinação da acidez por titulação com indicador e por titulação potenciométrica da matriz polpa de tomate.....61	61
Tabela 37 – Teste de Grubbs .....61	61
Tabela 38 – Teste de Cochran.....61	61
Tabela 39 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a determinação de acidez .....62	62
Tabela 40 - Parâmetros de precisão intermédia do método de determinação de acidez..63	63
Tabela 41 – Avaliação da exatidão do método de determinação de acidez .....64	64
Tabela 42 - Componente da precisão intermédia para o cálculo de incerteza .....65	65
Tabela 43 - Valor de incerteza expandida estimada .....66	66
Tabela 44 – Valores críticos para o teste de Grubbs.....71	71
Tabela 45 – Valores críticos para o teste de Cochran.....72	72

## Lista de Abreviaturas

BIPEA – *Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques*

DPCS – Amostra diária de controlo (*Daily Process Control Sample*)

EN – Norma Europeia (*European Standard*)

ISO – Organização Internacional de Normalização (*International Organization of Standardization*)

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

MRC – Material de referência certificado

NP – Norma portuguesa

UV/Vis – Ultravioleta-visível

# 1. Introdução

A preocupação com uma alimentação adequada é progressivamente mais relevante nos dias de hoje, o acesso a alimentos seguros e nutritivos é um requerimento essencial para a saúde e o bem-estar. Consequentemente a indústria alimentar tem vindo a apostar significativamente na garantia da segurança alimentar dos seus produtos alimentares reduzindo assim os riscos associados à exposição do consumidor a alimentos contaminados ou inseguros [1,2].

O controlo de qualidade inclui a avaliação de um produto final antes da sua comercialização. Este tem por base verificações de qualidade no fim de uma cadeia de produção, que vão definir se um dado produto alimentar deve ser comercializado.

A garantia de qualidade consiste na implementação de verificações de qualidade e procedimentos de forma a corrigir qualquer erro que possa influenciar a qualidade do produto [3].

A análise de produtos alimentares engloba a avaliação de propriedades sensoriais, químicas, microbiológicas e físicas dos alimentos, assegurando que a qualidade, segurança alimentar e rastreabilidade dos alimentos estão de acordo com a legislação e as exigências dos consumidores [1,4].

A validação de um método analítico é um meio de garantir a qualidade analítica, tendo como objetivo a uniformização de critérios de modo a demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é executado tem as características essenciais para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida [5].

## 1.1. Silliker Portugal, SA

A Silliker Portugal, S.A. (Figura 1), parte integrante da Mérieux NutriSciences, é uma empresa independente de prestação de serviços ao setor agroalimentar, que visa a melhoria da qualidade e segurança alimentar. Foi fundada no ano de 1992 como EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., em Vila Nova de Gaia passando a fazer parte do grupo Silliker em 2008 [6].

A garantia da qualidade dos serviços que a empresa oferece assenta na adequação dos métodos analíticos, e na constante atualização dos procedimentos e equipamentos, assim como na competência da equipa [1].



Figura 1 – Instalações da Silliker Portugal, S. A

A Silliker responsabiliza-se por cumprir os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025 na realização dos seus ensaios, e a satisfazer as necessidades dos seus clientes, das entidades regulamentadoras ou das organizações que efetuam o reconhecimento [6].

A empresa oferece diversos serviços (Figura 2), dos quais fazem parte o serviço de controlo analítico de alimentos, controlo analítico de água, monitorização alimentar, serviços de investigação, consultadoria em segurança e qualidade alimentar, análise sensorial e estudos do consumidor, consultadoria em rotulagem de géneros alimentícios, formação e auditorias e inspeções. O serviço de controlo analítico de alimentos inclui informação sobre a análise nutricional, aditivos, contaminantes, controlo do risco de alergénios, avaliação da conformidade do material de embalagem em contacto com os alimentos e ensaios físicos em embalagens [6,7].

Os laboratórios Silliker são acreditados, de acordo com a ISO/IEC 17025, por um organismo independente, que realiza uma avaliação objetiva das competências técnicas, garantindo a precisão e exatidão dos resultados analíticos [1].

Na Silliker Portugal os laboratórios estão divididos em três unidades independentes, o laboratório de Físico-Química de técnicas clássicas de análise, o laboratório de Métodos Instrumentais de Análise para técnicas cromatográficas e espectrofotométricas e o laboratório de Microbiologia para a determinação da presença microrganismos [1].



Figura 2 - Esquema representativo da divisão estrutural da Silliker Portugal

## 1.2. Objetivos do estágio

O presente trabalho foi realizado em contexto de estágio curricular do Mestrado de Bioquímica da Faculdade de Ciências do Porto, na empresa Silliker Portugal.

Os objetivos deste trabalho consistiram na validação de dois métodos analíticos. O primeiro método a validar foi o método de determinação do teor de fósforo total utilizando a técnica de espectrofotometria de absorção molecular para novos grupos e matrizes alimentares, a partir da norma NP-874 Alimentos para animais, Determinação do teor de fósforo total, Método espectrofotométrico [8]. O segundo método a validar foi o método de determinação da acidez por titulação da norma NP-1421 Géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas, Determinação de acidez [9]. Por fim pretendeu-se a aquisição de conhecimentos práticos sobre a validação e aplicação de métodos de análise química na área da qualidade e segurança alimentar assim como o desenvolvimento de competências profissionais em contexto de trabalho num laboratório acreditado.

## 2. Validação de métodos

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros podendo estes ser sistemáticos e/ou aleatórios, que em certas situações, alteram de forma significativa o valor do resultado final. Assim é crucial que um laboratório disponha de meios e critérios objetivos, para demonstrarem, que os métodos internos de ensaio que executam, conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida, o que ocorre através da sua validação [5].

A validação de métodos de ensaio tem como objetivo assegurar que cada resultado obtido durante a análise é próximo o suficiente do valor verdadeiro desconhecido do analito na amostra analisada [10]. Sempre que o método em causa não é normalizado, ou seja não é a aplicação direta de uma norma, tendo adaptações ou modificações de uma norma existente, é necessário a validação do método. Quando se pretende validar um método interno de ensaio ter-se-á de efetuar a sua descrição e caracterização, de forma a que qualquer pessoa com uma preparação adequada o possa executar [5].

A validação de métodos deve ser adaptada a cada caso, sendo progressivamente mais exigente e exaustiva para as situações sucessivamente indicadas:

- 1 - Método normalizado (método para o qual já existe uma norma anteriormente validada).
- 2 - Uma modificação menor da técnica, do equipamento ou do tipo de matriz a ensaiar, a uma norma existente, as alterações realizadas não tenham influencia sobre a equivalência técnica do resultado.
- 3 - Uma modificação maior à técnica, equipamento e/ou tipo de matriz a ser analisada, a uma determinada norma.
- 4 - Método que tenha por base técnicas de ensaio ou medição para as quais não exista uma norma de ensaio/calibração, mas a sua aplicação seja descrita na literatura científica.
- 5 - Método com base em técnicas de ensaio ou medição conhecidas, em que a aplicação pretendida ao ensaio não esteja descrita.
- 6 - Método assente em técnicas de ensaio ou medição inovadoras, que não possuem descrição na literatura científica [11].

A validação do método pode ser efetuada por avaliação indireta e/ou avaliação direta. A avaliação indireta consiste na determinação e evidência de parâmetros característicos, em termos da sua representatividade em relação ao objetivo do ensaio, dos fundamentos



teóricos que suportam o método, das possíveis interferências e fontes de erro de forma a definir a aplicabilidade e execução do mesmo. Pretende-se também estudar a otimização das condições de operação e/ou da sua robustez que possibilitam a otimização da execução do método e realizar uma análise para determinados parâmetros, de que são exemplo a gama de trabalho/linearidade, limiares analíticos de deteção e quantificação, sensibilidade, precisão e exatidão. Os parâmetros a analisar vão depender do tipo de método em causa. Sendo que, em análise qualitativa, somente são determinados o limite de deteção, a seletividade/especificidade e a robustez uma vez que não faria sentido avaliar os restantes parâmetros. Na análise quantitativa, todos os parâmetros anteriormente referidos são importantes.

A avaliação direta faz a comparação do método com métodos normalizados ou de referência, com padrões ou materiais de referência certificados e com comparações de estudos interlaboratoriais [5,11,12].

## 2.1. Avaliação indireta

### 2.1.1. Especificidade/Seletividade

Um método analítico diz-se seletivo quando permite identificar e distinguir um analito relativamente a outras substâncias presentes na amostra em análise, ou seja, assegura que o sinal obtido provem apenas e só do analito. A seletividade vai depender do princípio de medida utilizado e do tipo de compostos a analisar.

A avaliação de interferentes que possam afetar a seletividade pode realizar-se através de um ensaio de recuperação, utilizando várias amostras de uma mesma matriz, em que se faz variar a concentração do analito. As amostras são analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade. Um método considera-se específico e seletivo se nos testes de recuperação, as taxas de recuperação forem próximas de 100%.

O êxito das taxas de recuperação irá ser dependente do tipo de método a validar, uma vez que irá condicionar os intervalos de recuperação admitidos. Os critérios de ensaios de recuperação realizados por um laboratório, que levam a aceitação ou rejeição das taxas de recuperação são definidos para cada método e estão descritos em procedimentos de controlo de qualidade [5,11].

### 2.1.2. Quantificação

A informação proveniente de ensaios efetuados, pode ser interpretada através do cálculo de diversos parâmetros, de que são exemplo as curvas de calibração, limiares analíticos e sensibilidade [5].

#### 2.1.2.1. Curva de Calibração

Em análise quantitativa, entende-se como calibração um processo que estabelece uma relação através do sinal obtido a partir de um sistema de medição e a concentração conhecida de uma dada substância.

As curvas de calibração são efetuadas sempre que se aplica o método respetivo, sendo a sua representação gráfica obrigatória.

Na elaboração de uma curva de calibração as soluções padrão devem distribuir-se uniformemente pela gama de trabalho, não devendo ser menos que cinco. Os padrões são medidos no equipamento analítico sob as mesmas condições das amostras a analisar.

O branco da calibração, solução que contém todos os reagentes à exceção do analito, é geralmente diferente de zero e deve ser incluído na curva de calibração, sempre que aplicável.

Quando se utiliza o método dos mínimos quadrados, o gráfico de calibração representa o sinal do equipamento em função da concentração, a partir do qual se faz a determinação da concentração de analito nas amostras, por interpolação da reta de calibração.

A aceitação de uma curva de calibração depende da definição do coeficiente de correlação, gama de trabalho, linearidade e declive [5,12].

#### **Coeficiente de correlação**

O coeficiente de correlação de uma curva de calibração deve ser maior ou igual a 0,995 para a sua aceitação [12].

#### **Gama de trabalho**

Para métodos que não envolvam o traçado de curvas de calibração, a gama de trabalho pode ser função da quantidade de amostra disponível, da boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos em volumetria. Quando os métodos implicam a execução de uma curva de calibração a gama de trabalho é avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias. No teste de homogeneidade de variâncias o primeiro e último padrão são analisados em dez réplicas independentes, as suas variâncias são determinadas e analisadas para a verificação de diferenças significativas. No caso da gama de trabalho já

estar estabelecida em referência bibliográfica reconhecida pode tornar-se desnecessário analisá-la [12].

### Linearidade

A análise da linearidade é feita através da representação gráfica da função, do cálculo e análise do coeficiente de correlação. Para a aceitação da curva de calibração o coeficiente de correlação deve ser superior ou igual a 0,995 e a representação gráfica deve ser uma reta [12].

### Declive

Em todas as retas de calibração deve determinar-se e fazer-se uma análise do declive. A reta de calibração é válida desde que o declive se encontre dentro do intervalo  $\bar{X} \pm 3\sigma$ , em que  $\bar{X}$  é a média do declive e  $\sigma$  o desvio padrão do declive. Estes parâmetros são definidos através de uma carta de controlo referente ao ano anterior, que deve conter pelo menos vinte entradas de declive referentes a diferentes ensaios. Estes critérios são aplicáveis desde que não ocorra alteração das condições experimentais (como por exemplo, diferente analista ou equipamento), caso contrário deverá ser emitida nova carta de controlo contemplando as novas condições [12].

#### 2.1.2.2. Limiares analíticos

##### Limite de deteção

O limite de deteção,  $LD$ , corresponde ao teor mínimo a partir do qual é possível a deteção de presença de analito, com razoável certeza estatística. É a mais pequena quantidade de substância que pode ser detetada numa dada amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato. Quantitativamente, o limite de deteção é dado pela seguinte expressão:

$$LD = x_0 + 3,3 \times S_0 \quad (1)$$

Em que,  $x_0$  corresponde à média de uma série, entre 10 a 20 ensaios, de brancos ou padrões vestígio preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e  $S_0$  é o desvio padrão associado a  $x_0$ .

Ou no caso de o método utilizar uma calibração linear, o  $LD$  obtém-se a partir da expressão abaixo.

$$LD = \frac{|3,3 \times S_{y/x}|}{b} \quad (2)$$

Em que,  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  o declive da mesma [12].

### Limite de quantificação

O limite de quantificação,  $LQ$ , é a menor concentração de analito a partir da qual é possível a sua quantificação com exatidão e precisão. Após a determinação do limite de quantificação, o valor do  $LQ$  deve ser testado na prática para se averiguar se a exatidão e a precisão são satisfatórias. O teste realiza-se em condições de precisão intermédia, recorrendo a uma série de padrões internos com concentrações próximas à do padrão de menor concentração utilizado na curva de calibração [12].

Quantitativamente, o  $LQ$  calcula-se da seguinte forma:

$$LQ = x_0 + 10 \times S_0 \quad (3)$$

Ou no caso de o método usar uma calibração linear, o  $LQ$  determina-se por:

$$LQ = \frac{|10 \times S_{y/x}|}{b} \quad (4)$$

Os limiares analíticos definem-se com base na média dos limites de deteção e quantificação obtidos a partir de uma série significativa de curvas de calibração, deve ser feita a atualização dos limiares analíticos sempre que se verificarem alterações de analista, equipamentos, condições ambientais ou outros fatores passíveis de influenciarem o método de ensaio [5,12].

#### 2.1.2.3. Sensibilidade

Sensibilidade pode definir-se como o acréscimo de valor lido  $\Delta L$  e a variação da concentração  $\Delta C$  correspondente a esse acréscimo.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (5)$$

Quando a curva de calibração obtida é um reta, pode assumir-se que a sensibilidade se mantém constante ao longo de toda a gama de trabalho e esta toma o valor do declive da reta [12].

### 2.1.3. Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados de ensaios independentes, repetidos com uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A dispersão de resultados pode ser avaliada por duas medidas de precisão, a repetibilidade e a reprodutibilidade. Ainda se considera uma outra medida que é intermédia entre as duas, a precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial [12].

#### 2.1.3.1. Repetibilidade

Limite de repetibilidade,  $r$ , é o valor abaixo do qual se deve encontrar, com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob as mesmas condições.

Se a diferença entre resultados for menor ou igual que o limite de repetibilidade os resultados das determinações são aceites. Caso seja maior que  $r$ , estes devem ser analisados de forma crítica e se necessário repetem-se os ensaios.

A determinação da repetibilidade pode ser realizada recorrendo a um ensaio interlaboratorial ou ensaios realizados no laboratório. Para avaliar a repetibilidade do método no próprio laboratório realizam-se uma série de medições (aproximadamente dez) sobre uma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Note-se que condições de repetibilidade neste contexto incluem o mesmo laboratório, mesmo operador e equipamento, durante um curto intervalo de tempo considerado. Num ensaio interlaboratorial o nível de medições pode ser menor, cerca de duas, para a determinação da repetibilidade. Em ambos os casos o cálculo deve ser efetuado separadamente para cada nível de concentração partindo dos resultados e depois da eliminação de valores discrepantes [12].

A variação de um método de análise pode estimar-se através da média ponderada das estimativas das variações de  $w$  séries de análises realizadas em condições de repetibilidade. A variância associada à repetibilidade do método, para cada nível  $i$  de concentração dá-se por:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \times S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)} \quad (6)$$

Onde  $S_{ri}^2$  é a variância de repetibilidade associada aos resultados de cada laboratório,  $S_{wi}^2$  é a variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório,  $n$  é o número

de medições,  $(n_{wi} - 1)$  é o número de graus de liberdade da série de análises e  $p$  o número de laboratórios participantes ou a série de ensaios realizados no laboratório [12].

Considerando um nível de confiança de 95% o limite de repetibilidade,  $r$ , determina-se da seguinte forma:

$$r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2} \quad (7)$$

O coeficiente de variação de repetibilidade,  $CV_r$ , para cada nível de concentração e expresso em percentagem, calcula-se através da expressão a seguir indicada:

$$CV_r(\%) = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (8)$$

O termo  $S_{ri}$  é o desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados, e  $\bar{x}$  a média dos valores [12].

#### 2.1.3.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia avalia a precisão sobre uma amostra ou amostras idênticas, utilizando o mesmo método e no mesmo laboratório, podendo variar uma ou mais das seguintes condições: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes épocas, com/sem verificação da calibração, entre outros.

#### Resumo da metodologia

Nas condições de trabalho de laboratório existem quatro fatores, tempo, operador, equipamento e calibração (Tabela 1), que têm maior impacto na variabilidade das medições.

Medições realizadas ao mesmo tempo são aquelas efetuadas no menor intervalo de tempo possível, de forma a reduzir a influência do meio ambiente nos resultados. Contrariamente, medições consideram-se medidas em tempos diferentes quando o intervalo de tempo entre estas é suficiente para que sejam afetadas pelas condições ambientais [12].

O operador pode ser qualquer analista do laboratório.

Um laboratório pode conter vários equipamentos para a mesma técnica analítica. Qualquer modificação de componentes importantes num dado equipamento leva a que este seja considerado como um equipamento diferente [12].

A presença ou ausência de calibração é referente à realizada, ou não, em série de ensaios e não à calibração de equipamentos.

O uso de reagentes com diferentes lotes pode ser visto como uma alteração de componentes que obriga a nova calibração (padrão).

Tabela 1 – Fatores que influenciam a variabilidade e as suas condições

Fator	Condições das medições no laboratório	
	Iguais	Diferentes
Tempo	Medições feitas ao mesmo tempo	Medições feitas em tempos diferentes
Operador	Mesmo operador	Diferentes operadores
Equipamento	Mesmo equipamento, sem re-calibração	Equipamento diferente
Calibração	Sem calibração entre medições	Com calibração entre medições

Como referido anteriormente, em condições de precisão intermédia, um ou mais fatores estão em condições diferentes descritas na Tabela 1 e definem-se como condições de precisão com dado número de fatores diferentes [12].

### Definição das condições de medida

As condições de precisão intermédia em que são efetuadas as medições devem ser cuidadosamente definidas, em especial o intervalo de tempo em que as medições são realizadas.

De forma geral o cálculo da precisão intermédia é deduzido a partir dos resultados obtidos dos ensaios analíticos por um de dois métodos, seguidamente à eliminação de resultados aberrantes através da aplicação do teste de Grubbs [12].

No método simplificado (ensaio único), o conjunto de amostras analisadas deve ser o mais semelhante possível, preferencialmente a mesma amostra ou amostras idênticas ou padrões. Deve realizar-se um conjunto de  $n$  ensaios (pelo menos quinze) com variações de um ou mais fatores. Quando comparado com o método alternativo, este método revela-se menos eficiente. O desvio padrão de precisão intermédia, tendo em conta este método, é dado por:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (9)$$

Onde,  $n$  é o número de ensaios efetuados por amostra/padrão,  $y_k$  é o resultado individual obtido e  $\bar{y}$  é a média aritmética dos resultados obtidos.

Por outro lado, pode recorrer-se ao método alternativo (ensaios com replicados), onde a precisão intermédia é determinada através do número de amostras ensaiadas,  $t$ , e do número de ensaios efetuados por cada amostra,  $n$ . Recomenda-se que o valor  $t(n - 1)$  seja igual ou superior a 15. Aqui o desvio padrão obtém-se da seguinte forma:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{t \times (n - 1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (10)$$

Sendo,  $t$  o número de amostras/padrões analisados,  $n$  o número de ensaio efetuados por amostra/padrão,  $j$  é o número da amostra/padrão, que vai de 1 a  $t$  amostras/padrões,  $k$  é o número do resultado obtido para a amostra/padrão  $j$ , de 1 a  $n$ ,  $y_{jk}$  é o resultado individual  $k$  para a amostra  $j$ , de 1 a  $t$  e  $\bar{y}_j$  é a média aritmética dos resultados da amostra  $j$ , de 1 a  $t$ . No caso de  $n=2$ , ou seja, dois ensaios por amostra, a expressão pode ser simplificada:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \times \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}, \text{ para } n = 2 \quad (11)$$

Aqui  $y_{j1}$  é referente ao primeiro resultado para a amostra/padrão  $j$  e  $y_{j2}$  ao segundo resultado da amostra/ padrão  $j$  [12].

### Metodologia

Utilizam-se dados analíticos sempre que estes estejam disponíveis em número suficiente. Em alternativa, devem ser definidas as amostras a analisar de acordo com as gamas de concentração a serem estudadas e estabelecer o período de tempo para a execução dos ensaios analíticos.

Os dados devem ser analisados estatisticamente através dos métodos normal ou alternativo anteriormente referidos. Caso existam faz-se a eliminação de “outliers” através do teste de Grubbs e proceder a nova análise tratamento estatística dos restantes dados. Realiza-se o cálculo do limite da precisão intermédia,  $r_i$ , através da seguinte expressão [5]:

$$r_i(\%) = \frac{S_i \times 100 \times 2,8}{M} \quad (12)$$

Em que,  $S_i$  é o desvio padrão da precisão intermédia e  $M$  é a média dos resultados obtidos.

O coeficiente de variação de precisão intermédia,  $CV_p$ , para cada nível de concentração e expresso em percentagem, calcula-se da através da expressão a baixo indicada [12]:



$$CV_p(\%) = \frac{S_i}{\bar{M}} \times 100 \quad (13)$$

#### 2.1.3.3. Teste de Grubbs

O teste de Grubbs faz a deteção de “outliers” ou valores discrepantes. Num conjunto de resultados em replicado de uma mesma amostra faz uma análise do valor mais alto e mais baixo. Para tal é necessário calcular o parâmetro  $G_p$  para o valor mínimo e máximo da série de  $p$  replicados.

$$G_p = \frac{(x_p - \bar{x})}{S} \quad (14)$$

Onde

$$\bar{x} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p x_i \quad (15)$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2} \quad (16)$$

Se o valor absoluto de  $G_p$  for menor ou igual ao valor crítico a 5%, então o valor testado será aceite como correto.

Se o valor absoluto de  $G_p$  for superior ao valor crítico a 5% e menor ou igual que o valor crítico de 1%, então o valor testado deve ser considerado.

Se o valor absoluto de  $G_p$  for superior ao valor crítico a 1%, então o valor testado é estatisticamente considerado um “outlier” e deverá ser eliminado. Neste caso deve-se gerar mais um resultado para o substituir [12,13].

#### 2.1.3.4. Teste de Cochran

O teste de Cochran permite detetar se há diferenças entre variâncias de um dado grupo de amostras ao identificar uma variância excessivamente grande em comparação com as restantes. Este é aplicado na validação de métodos de ensaio para verificar a homogeneidade de variância na repetibilidade.

O valor do C de Cochran é calculado comparando o valor mais alto de variância com a soma de todas as variâncias do conjunto de  $n$  resultados em replicado.

$$C \text{ de Cochran}_{\text{calculado}} = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad (17)$$

Em que  $s_i^2$  é a variância de cada conjunto de replicados,  $s_{\max}^2$  é a maior variância obtida e  $p$  o número de variâncias calculadas [13,14].

O valor testado será aceite como correto, se o valor de C de Cochran calculado for menor ou igual ao valor crítico a 5%.

Se o valor calculado de C de Cochran for superior ao valor crítico a 5% e menor ou igual do que o valor crítico de 1%, então o valor testado deve ser considerado.

O valor testado é considerado um “outlier” estatístico ou valor discrepante, quando o valor de C de Cochran é superior que o valor crítico a 1%. Neste caso deve eliminar-se a matriz de maior variância e repetir o teste para os restantes resultados. Os valores críticos para o teste de Cochran estão presentes na Tabela 45 em anexo.

Os critérios do teste são aplicáveis somente quando todas as variâncias derivam do mesmo número ( $n$ ) de resultados obtidos em condições de repetibilidade. Porém este número pode variar devido à eliminação de alguns resultados após análise estatística. No entanto pode assumir-se que num ensaio devidamente organizado as variações no número de resultados serão limitadas podendo ser ignoradas, por conseguinte, o critério de Cochran aplica-se para  $n$ , o número de resultados que ocorrem na maior parte das células [13].

## 2.2. Avaliação direta

A avaliação direta tem como fim conhecer a exatidão do método de ensaio. Entende-se por exatidão a concordância entre o resultado obtido a partir de dado ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. A sua avaliação é feita através de uma de duas metodologias, utilizando materiais de referência certificados ou ensaios de comparação interlaboratorial [5,12].

### 2.2.1. Materiais de referência certificados

Um material de referência certificado (MRC) define-se como um material de referência em que o valor de uma ou mais grandezas que foi certificado por um processo tecnicamente válido tendo uma incerteza associada. Estes materiais são um meio de controlo externo da qualidade de uma análise química. O desempenho do laboratório é avaliado recorrendo à análise dos materiais de referência certificados. O valor obtido no ensaio é comparado com

o valor certificado do material de referência, de onde se determina o erro e exatidão da análise. Estando o valor obtido fora do intervalo de incerteza associado, deverá encontrar-se a razão do desvio observado e eliminá-la ou aceitá-la justificando a decisão [5,12].

### 2.2.2. Ensaio de comparação interlaboratorial

Conforme o seu propósito, um ensaio interlaboratorial pode ter variados tipos.

Um ensaio interlaboratorial de aptidão pretende avaliar o desempenho dos laboratórios, podendo em alguns países ser uma condição para acreditação do laboratório. Preferencialmente deve estar rastreado a um material de referência certificado. O método de ensaio utilizado fica a critério do laboratório participante.

Um ensaio interlaboratorial de normalização visa o estudo das características de um dado método de análise, em termos de reprodutibilidade e repetibilidade. Neste caso apenas pode ser usado o método em questão.

Assim o ensaio interlaboratorial de normalização é adequado para a avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade de um método, permitindo também avaliar a precisão do método em relação a outros laboratórios. Enquanto o ensaio de aptidão permite a avaliação da exatidão dos resultados obtidos [5].

## 2.3. Incerteza do método

A incerteza de medição é um parâmetro não negativo que se associa ao resultado de uma medição, esta caracteriza a dispersão de valores atribuídos a uma grandeza medida [12,15].

A incerteza de um método de ensaio pode ser calculada a partir da precisão e da exatidão do método.

A componente da precisão da estimativa da incerteza pode ser calculada com base nos dados do controlo da qualidade proveniente das amostras de controlo diário dos processos (DPCS, *Daily Process Control Samples*) e/ou estudos dos duplicados.

A componente da exatidão da estimativa da incerteza calcula-se através de resultados dos ensaios de comparação interlaboratorial, resultados dos estudos efetuados com materiais de referência certificados e resultados das amostras fortificadas.

A incerteza pode ser determinada por gamas de trabalho, por matrizes ou por combinação de ambas [12].

### 2.3.1. Incerteza padrão combinada

Considerando uma série de  $n$  medições, a incerteza combinada vai corresponder ao somatório da contribuição ( $u_i$ ) de cada medição.

$$u = \sqrt{\sum_{i=1}^n u_i^2} \quad (18)$$

### 2.3.2. Incerteza expandida de medição

A incerteza expandida,  $U$ , é obtida através da multiplicação da incerteza padrão combinada,  $u$ , da estimativa da grandeza por um fator de expansão ou cobertura,  $k$ .

$$U_{\text{expandida}} = k \times u_{\text{combinada}} \quad (19)$$

Nos casos em que se possa atribuir uma distribuição normal aos resultados da grandeza medida e a incerteza padrão associada à estimativa da grandeza tenha fiabilidade suficiente, deve utilizar-se como fator de expansão  $k=2$ . A incerteza expandida estimada corresponde a uma probabilidade de expansão de cerca de 95% [15].

## 3. Determinação do teor de fósforo total

Segundo a NP-874, o método de determinação do teor de fósforo total por espectrofotometria de absorção molecular encontrava-se validado para a matriz de alimentos para animais. Neste trabalho realizou-se a validação do mesmo método com o mesmo procedimento referido na norma e equipamento já utilizados, mas para outras matrizes alimentares.

### 3.1. Fósforo

O fósforo é um não-metal que na natureza pode ser encontrado na sua forma mais abundante como ião fosfato,  $\text{PO}_4^{3-}$  (Figura 3). Na forma de ião fosfato é um constituinte essencial dos tecidos de plantas e animais, necessário para as funções metabólicas e estruturais humanas, sendo incorporado em várias moléculas orgânicas. À exceção do

tecido nervoso e de algumas células especializadas, a concentração de fósforo nos tecidos é aproximadamente de 7,8 a 20,1 mg por grama de proteína [16–18].

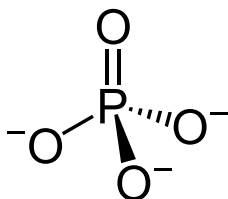


Figura 3 – Fórmula do ião fosfato.

O fósforo constitui cerca de 0,5% do organismo de um recém-nascido e entre 0,65 a 1,1% do corpo de um adulto. Dos quais 85% do fósforo num adulto estão presentes nos ossos e os restantes 15% encontram-se distribuídos pelos tecidos moles. A sua concentração no sangue é de 40 mg/dl, em que aproximadamente 3,1 mg/dl está na forma de fosfato inorgânico. Apesar de só representar menos de 0,1% do conteúdo total de fósforo, o fosfato inorgânico é de grande importância [16].

O fósforo proveniente da dieta é consumido geralmente sob a forma de sais de fosfato e moléculas de organofosfato. Os fosfatos são especialmente abundantes em produtos animais, incluindo carnes, peixes, ovos, leite, queijo e iogurtes. Em quantidades mais reduzidas também se encontram presentes em grãos de cereais e em diversos vegetais [17].

A dose diária recomendada de fósforo é aproximadamente 700 mg por dia, podendo variar conforme a idade e o género, com um limite máximo de 3500 a 4000 mg [19].

A deficiência grave neste elemento pode levar a hipofosfatemia, que ocorre quando os níveis de fósforo no sangue são menores que 2,3 mg/dl. Esta condição pode causar anorexia, anemia, fraqueza muscular, dor óssea, raquitismo e osteomalacia, debilidade generalizada, aumento de suscetibilidade a infeções, parestesias, ataxia, confusão e em casos extremos a morte [16].

### 3.2. Espectrofotometria de absorção molecular

A técnica de absorção no ultravioleta e visível é principalmente utilizada para a análise quantitativa, para a identificação e determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, sendo provavelmente a mais aplicada em laboratórios de química. A concentração de analito em solução é determinada ao medir a absorvância a um determinado comprimento de onda e aplicando a lei de Lambert-Beer.

A absorção ocorre quando há interação de fótons de uma fonte com os íões ou moléculas da amostra. Quando a molécula absorve um fóton da região ultravioleta-visível, a energia correspondente é capturada por um ou mais dos eletrões de valência, o que provoca transições entre estados de energia [20].

Compostos que não absorvem radiação na região do UV/Vis podem igualmente ser determinados por espectrofotometria através da reação com reagentes cromóforos que origina produtos que absorvem fortemente nesta região. Utilizando este método torna-se possível a quantificação de analitos que absorvem fracamente ou cuja absorção se encontra numa região do espectro onde existem absorções por parte de outras espécies químicas que podem interferir com a leitura. A reação de transformação deve ser específica, total, rápida e reprodutível, originando derivados estáveis que absorvam na região UV/Vis [20,21].

O equipamento utilizado na espectroscopia de absorção molecular é o espectrofotómetro, que é constituído por três componentes fundamentais: a fonte de radiação, o sistema de dispersão (ou monocromador) e o sistema de deteção (Figura 4). O compartimento da amostra pode ser colocado antes ou depois do sistema de dispersão dependendo do tipo de equipamento [20].

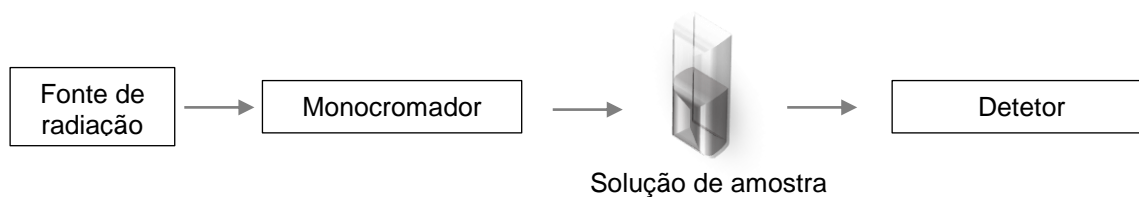


Figura 4 – Esquema representativo dos componentes de um espectrofotómetro para o UV/Vis.

Um mesmo equipamento pode ter mais que um tipo de fonte de radiação, alternando automaticamente durante o varrimento UV/Vis. Para a região visível pode ser utilizada uma lâmpada com filamento tungsténio, na zona do ultravioleta é adequado o uso de uma lâmpada de deutério (<350 nm) ou de forma a abranger toda a região de 200 a 1100 nm, pode ser utilizada uma lâmpada de xénon [20].

Os sistemas de dispersão e os monocromadores podem ter um arranjo sequencial ou simultâneo.

Os detetores convertem a intensidade da radiação num sinal elétrico. Existem dois tipos de detetores que podem ser utilizados, um tubo fotomultiplicador ou um semiconductor.

Os espectrofotómetros podem ser de três tipos: espectrofotómetro fixo com um feixe de radiação único e um suporte para uma amostra; espectrofotómetro de varrimento com feixe

duplo e dois suportes para amostras para a medição automática de absorvância; e espectrofotómetro sem varrimento com um detetor de matriz para a medição simultânea de vários comprimentos de onda [20].

### 3.3. Lei de Lambert-Beer

As medições por espectrofotometria de absorção molecular têm por base a lei de Lambert-Beer, que estabelece uma relação entre a absorção de radiação e a concentração de um composto em solução, sob determinadas condições:

$$A = \varepsilon_{\lambda} l C \quad (20)$$

Onde  $A$ , representa a absorvância,  $l$  é a espessura em centímetros da solução em que o feixe de radiação incide,  $C$  é a concentração molar e  $\varepsilon_{\lambda}$  é o coeficiente de absortividade molar medido em litro por mole por centímetro a um determinado comprimento de onda  $\lambda$  a que a leitura é realizada. O coeficiente de absortividade molar é um parâmetro característico de cada composto e está dependente de algumas condições entre as quais a temperatura e a natureza do solvente utilizado, de uma forma geral o seu valor é correspondente ao comprimento de onda para o qual a absorção do analito é máxima [20].

Segundo a hipótese de Lambert, a intensidade da radiação monocromática,  $I$ , diminui ao passar por uma dada espessura,  $l$ , de um material. A intensidade de radiação pode relacionar-se com a absorvância através das seguintes expressões:

$$A = \frac{\log I_0}{I} \quad (21)$$

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (22)$$

$$A = 2 - \log T\% \quad (23)$$

Onde  $I_0$ , é a intensidade da radiação incidente antes de atravessar o material e  $I$  é a intensidade de radiação transmitida após atravessá-lo e  $T$  é a transmitância.

Na determinação da concentração de um dado analito, a absorvância deve ser medida no comprimento de onda para qual a absorção de radiação do analito é máxima. De maneira a absorvância se poder relacionar com a concentração, a largura da banda do espectro de

absorção que é captada pelo detetor seja menor que a largura da banda de absorção medida a meia altura [20].

Neste método de espectrofotometria de absorção molecular para a determinação do teor de fósforo total, o objetivo era a validação do mesmo procedimento da norma NP-874 [8] para a matriz alimentos para animais, mas alterando as matrizes alimentares utilizadas.

### 3.4. Procedimento

#### 3.4.1. Objetivo

Determinação do fósforo total, realizada por espectrofotometria de absorção molecular, na região no visível.

#### 3.4.2. Resumo do processo

Primeiramente a amostra é carbonizada, o resíduo resultante é então incinerado e solubilizado por ácido clorídrico, para a eliminação da matéria orgânica. De forma a ser possível a determinação do fósforo por espectrofotometria, há uma reação da solução da amostra com reagente vanadomolibdico (o molibdato de amónia reage com o anião fosfato para formar fosfomolibdato de amónia, um produto de coloração amarela). Faz-se a leitura da absorvância da coloração amarela obtida, em espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 430 nm.

#### 3.4.3. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados devem ser de qualidade analítica e a água deve ser desionizada.



Tabela 2 – Reagentes utilizados

Reagente	Marca	Pureza
Carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ )	Merck	$\geq 99\%$
Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ )	Sigma-Aldrich	Densidade entre 1,37 a 1,41 g/ml
Ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ )	Sigma-Aldrich	Densidade 1,18 g/ml
Amónia ( $\text{NH}_3$ )	Merck	Pureza mínima 25 % e densidade 0,91 g/ml
Molibdato de amónio tetrahidratado $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$
Monovanadato de amónio $[(\text{NH}_4)\text{VO}_3]$	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$
Dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$

## Soluções

- Solução de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), 1 mol/l:

Medir 66 ml de ácido nítrico para um balão volumétrico de 1000 ml que já contenha, aproximadamente, 500 ml de água. Completar o volume com água e homogeneizar.

- Solução de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ), 6 mol/l:

Medir 500 ml de ácido clorídrico para um balão volumétrico de 1000 ml que já contenha, aproximadamente, 400 ml de água. Arrefecer, perfazer o volume com água e homogeneizar.

- Hidróxido de amónia ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), 14 mol/l:

Medir 845 ml de amónia para um balão volumétrico de 1000 ml. Perfazer o volume com água e homogeneizar.

- Solução de heptamolibdato de amónio:

Pesar 100 g de molibdato de amónio tetrahidratado, dissolver com água quente e transferir para um balão volumétrico de 1000 ml. Arrefecer, adicionar 10 ml de hidróxido de amónia, completar o volume com água e homogeneizar.

- Solução de monovanadato de amónio:

Pesar 2,35 g de monovanadato de amónio, transferir para um balão volumétrico de 1000 ml com água quente e dissolver a totalidade do soluto. Caso necessário, introduzir uma barra magnética no balão volumétrico e colocar no agitador magnético até dissolução

completa. Arrefecer a solução e adicionar, lentamente e agitando sempre, 7 ml de ácido nítrico. Completar o volume com água e homogeneizar.

- Reagente vanadomolibdico:

Medir 200 ml da solução de heptamolibdato de amónio para um balão volumétrico de 1000 ml. Adicionar 100 ml da solução de monovanadato de amónio e 135 ml de ácido nítrico. Arrefecer, completar o volume com água e homogeneizar.

- Solução padrão de fósforo,  $c(P) = 1 \text{ mg/ml}$ :

Pesar 4,394 g, de dihidrogenofosfato de potássio, dissolver com água e transferir para um balão volumétrico de 1000 ml. Completar o volume com água e homogeneizar.

- Soluções padrão para a reta de calibração com concentrações de 2,5 a 40  $\mu\text{g}$  de P/l.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume pipetar (ml)	Volume final (ml)
2,5	2,5	1000
5	5	1000
10	5	500
20	10	500
30	15	500
40	20	500

#### 3.4.4. Aparelhos e utensílios

Material de laboratório de uso corrente e, nomeadamente:

- Balança analítica, capaz de pesar com a aproximação de 0,1 mg (Sartorius BP 221 S);
- Cápsulas de porcelana com fundo redondo;
- Tubos de plástico com tampa e com capacidade de 30 ml;
- Balões volumétricos de diferentes volumes;
- Provetas de vidro de diferentes volumes;
- Gobelés de vidro de 250 ml;
- Matrizes de vidro de 125 ml;
- Pipetas volumétricas de diferentes volumes;
- Pipetas graduadas de diferentes volumes;
- Mufla elétrica regulável a  $550^\circ\text{C} \pm 20^\circ\text{C}$  (Barnstead Thermolyne);

- Placa de aquecimento elétrica (Combiplac);
- Papel de filtro;
- Exsicador, contendo agente exsicante com indicador de humidade;
- Espectrofotómetro UV/Vis (Shimadzu UV-1800) com monocromador (Montagem Czerny-Turner, ótica tipo duplo feixe), equipado com células de percurso ótico de 1 cm.

#### 3.4.5. Preparação de amostras

Todas as amostras são devidamente preparadas e homogeneizadas.

#### 3.4.6. Técnica

##### 3.4.6.1. Ensaio em branco

Efetuar paralelamente um ensaio em branco segundo o procedimento indicado, mas na ausência da amostra. Na toma apenas se pesa 1g carbonato de cálcio.

##### 3.4.6.2. Metodologia

Pesar, para uma cápsula de porcelana, 2,5 g da amostra e registar a massa.

Sem retirar a cápsula da balança, adicionar 1 g de carbonato de cálcio.

Colocar a cápsula de porcelana contendo a toma para análise na placa de aquecimento e aquecer lentamente até à carbonização da amostra.

Transferir a cápsula de porcelana para a mufla e calcinar até à obtenção de cinza branca ou cinzenta.

Deixar arrefecer a cápsula contendo o resíduo.

Transferir a totalidade da cinza para um gobelé, com 20 a 50 ml de água.

Adicionar, com uma pipeta, a solução de ácido clorídrico até terminar a efervescência.

Adicionar 10 ml da solução de ácido clorídrico.

Colocar o gobelé sobre a placa de aquecimento e evaporar à secura para insolubilização da cinza.

Arrefecer e adicionar 10 ml da solução de ácido nítrico.

Colocar o gobelé sobre a placa de aquecimento, levar à ebulição, mantendo-a durante aproximadamente 5 minutos, tendo o cuidado de não deixar secar. Deixar arrefecer.

Transferir quantitativamente o resíduo, com auxílio de água quente, para um balão volumétrico de 500 ml.

Lavar o gobelé várias vezes com água quente, transferindo as águas de lavagem para o balão volumétrico.

Deixar arrefecer, completar o volume com água e homogeneizar.

Colocar um papel de filtro num funil de filtração colocado num matraz e filtrar o conteúdo do balão. Rejeitar, aproximadamente, os primeiros vinte mililitros do filtrado.

#### 3.4.6.3. Desenvolvimento da coloração

##### **Soluções padrão para a reta de calibração**

Pipetar 10 ml de cada uma das soluções de calibração, para um tubo de plástico.

Efetuar um ensaio branco:

Pipetar 10 ml de água, para um tubo de plástico.

Adicionar 10 ml do reagente vanadomolibdico a cada um dos tubos.

Colocar as tampas nos tubos de plástico, homogeneizar e deixar em repouso durante pelo menos 10 minutos à temperatura ambiente.

##### **Amostras**

Pipetar 10 ml do filtrado obtido na secção 3.4.6.2 para um tubo de plástico.

Adicionar 10 ml do reagente vanadomolibdico.

Colocar a tampa no tubo de plástico, homogeneizar e deixar em repouso durante, pelo menos, 10 minutos à temperatura ambiente.

Se necessário, diluir uma alíquota do filtrado obtido na secção 3.4.6.2 de modo a obter uma concentração em fósforo não superior a 40 µg/ml. Proceder como anteriormente descrito.

#### 3.4.6.4. Medição da absorvância

Medir a absorvância de cada uma das soluções, no espectrofotómetro, a 430 nm.

##### **Soluções padrão para a reta de calibração**

Estabelecer a curva de calibração registando os valores das absorvâncias medidas, corrigidas com o valor do ensaio em branco, definido na secção 3.4.6.3.

##### **Amostras**

Registar os valores das absorvâncias medidas, corrigidas com o valor do ensaio em branco, definido na secção 3.4.6.1.

### 3.4.7. Matrizes

Açúcar, produtos açucarados e derivados:

Achocolatado,  
Chocolate com frutos secos,  
*Spread (BIPEA 2016).*

Alimentos confeccionados e pré-confeccionados:

*Cordon bleu (BIPEA 2016),*  
*Ready-made dish with meat (BIPEA 2013).*

Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial:

*Dietary biscuit (BIPEA 2015),*  
*Dietary supplement (BIPEA 2015),*  
Farinha não láctea.

Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados:

Arroz,  
Aveia,  
*Cereals (BIPEA 2015),*  
Farinha de trigo,  
Feijão seco.

Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados:

Amêndoa,  
Caju,  
Cogumelos inteiros em conserva,  
Feijão em conserva.

Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados:

Linhaça,  
Sementes de chia,  
Sementes de girassol.

## 4. Determinação da acidez em géneros alimentícios derivados de frutos e de produtos hortícolas

O método para a determinação do teor de acidez, já se encontrava normalizado, ou seja, já existia uma norma anteriormente validada (NP-1421) para matrizes que pertencessem ao grupo alimentar frutos, algas, produtos hortícolas e derivados. A Silliker considera que um método deve ser validado pelo menos de cinco em cinco anos. Assim, realizou-se a revalidação do método para a norma existente e o mesmo grupo alimentar.

### 4.1. Acidez nos alimentos

A acidez tem um papel importante na estabilidade e preservação dos alimentos, pois é um fator no controlo de reações químicas, bioquímicas e microbiológicas [22]. A determinação de acidez em alimentos permite avaliar o estado de conservação de um produto alimentar. A decomposição dos glicéridos é acelerada pelo calor e pela luz, sendo a rancificação oxidativa na maioria das vezes acompanhada pela formação de ácidos gordos livres. Os métodos de determinação de acidez podem determinar a acidez por titulação ou a concentração de iões de hidrogénios livres, por meio do pH [22,23].

Acidez titulável define-se como a medida da quantidade de ácido presente numa solução, expressa-se gramas por litro (g/L). O pH define-se como a medida da força do ácido em solução. O pH utiliza uma escala logarítmica, onde 7 é considerado neutro, quanto menor a leitura do pH mais ácida será a solução, quanto maior a leitura na escala de pH, mais alcalina é a solução [24].

A titulação da acidez é realizada com uma solução de concentração conhecida e um indicador de viragem. Esta solução, denomina-se de solução padrão e é geralmente uma solução de hidróxido de sódio, NaOH, sendo o indicador mais utilizado a fenolftaleína [22,23].

## 4.2. Procedimento

### 4.2.1. Objetivo

Fixar o processo para determinar a acidez de géneros alimentícios derivados de frutos e produtos hortícolas.

### 4.2.2. Definição

Entende-se por acidez, o volume de solução alcalina normal, expresso em mililitros, necessário para neutralizar 100 mililitros de amostra, quando esta for líquida, ou 100 gramas, quando for pastosa ou sólida.

### 4.2.3. Resumo do processo

Titulação potenciométrica ou à viragem da fenolftaleína como indicador, em meio aquoso, com solução de 0,1 N de hidróxido de sódio.

### 4.2.4. Reagentes e soluções

Reagente	Marca	Pureza
Fenolftaleína	Sigma-Aldrich	≤ 100%
Hidróxido de sódio (NaOH)	Merck	≥ 99%

- Solução alcoólica de fenolftaleína a 1 g/100 ml:

Dissolve-se 1 g de fenolftaleína em álcool etílico, a 95% em volume, até completar 100 ml.

- Solução 0,1 N de hidróxido de sódio.

Dissolve-se 4.00g de hidróxido de sódio em água, até completar um volume de 1000 ml.

### 4.2.5. Aparelhos e utensílios

- Agitador magnético (Agimatic-E).
- Balança analítica, capaz de pesar com a aproximação de 0,1 mg (Sartorius BP 221 S);
- Balão volumétrico de 250 ml.

- Bureta graduada de 50 cm<sup>3</sup>, graduadas em décimos de centímetro cúbico.
- Filtro de papel.
- Gobelés de vidro de 50 ml.
- Gobelés de plástico de 50 ml.
- Matrazes de, pelo menos, 200 ml.
- Pipetas volumétricas de 25 e 50 ml.
- Potenciómetro com elétrodos de vidro (Jenway 3510).
- Proveta de 50 ml.
- Termómetro graduado na escala de Celsius, pelo menos entre 5°C e 50°C.

#### 4.2.6. Preparação de amostras

Executa-se primeiro, sempre que necessário, a homogeneização da amostra, de forma a que não haja diferenças visíveis na sua constituição.

##### 4.2.6.1. Produtos líquidos ou cuja parte líquida seja, facilmente separável, sólidos, pastosos e produtos dificilmente filtráveis

Pesa-se uma toma de 25 g  $\pm$  0,001 g da amostra homogeneizada para um gobelé de plástico de 50 ml. Transfere-se para um balão volumétrico de 250 ml com água destilada, perfaz-se e homogeneiza-se. Filtra-se para um matraz de 250 ml, utilizando filtro de papel.

##### 4.2.6.2. Produtos recentemente preparados, embora com fase sólida e líquida distintas

Procede-se de igual forma à preparação dos produtos líquidos, sólidos, pastosos e produtos dificilmente filtráveis.

##### 4.2.6.3. Produtos secos ou congelados

Retiram-se pedúnculos, caroços, alvéolos carpelares e grainhas, quando possível. No caso de produtos congelados, torna-se necessária a descongelação prévia.

Reduz-se a parte edível assim separada a pequenas partículas com auxílio de triturador ou almofariz, sem desprezar o líquido próprio do produto, que resulta da descongelação.

Em seguida, procede-se de igual forma à preparação dos produtos líquidos, sólidos, pastosos e produtos dificilmente filtráveis.



#### 4.2.7. Técnica

##### 4.2.7.1. Toma para análise

Para um gobelé de vidro 50 ml, no caso da titulação potenciométrica, ou para um matraz de 250 ml, no caso da titulação com indicador, medem-se, por pipeta volumétrica, 25 ml a 100 ml do filtrado obtido na preparação de amostra.

##### 4.2.7.2. Determinação

A determinação prossegue por titulação potenciométrica ou à viragem por indicador.

##### **Titulação potenciométrica**

Por intermédio de uma bureta graduada, adiciona-se rapidamente ao líquido contido no gobelé, um volume de solução de hidróxido de sódio, necessário para atingir pH de 6, aproximadamente determinado por potenciómetro previamente calibrado com solução de pH adequado. Continua-se a titulação, mas agora lentamente, até pH 7. Em seguida, procede-se à leitura exata do pH e do volume gasto, de quatro em quatro gotas, até o pH ser da ordem de 8,3.

Calcula-se, por interpolação, o volume exato da solução, necessário para obter o pH de 8,1.

A titulação deve ser repetida. São válidas duas titulações cuja diferença entre os volumes gastos não exceda 2% da média de ambos.

Durante a titulação mantém-se o líquido em agitação por intermédio de um agitador mecânico ou magnético.

##### **Titulação com indicador**

Adicionam-se, pelo menos, três gotas de solução alcoólica de fenolftaleína ao líquido contido no matraz e, agitando manualmente, titula-se com solução de hidróxido de sódio, contida na bureta graduada, até à viragem para a coloração rosada, persistente pelo menos 30 segundos.

A titulação deve ser repetida, sendo a condição de validade de duas titulações idêntica à determinação por titulação potenciométrica.

##### 4.2.7.3. Cálculo dos resultados

A acidez do produto expressa em ml de solução alcalina (NaOH 1 N) por 100 ml ou por 100 g de produto, dá-se por:

$$\text{Acidez} = \frac{\text{Volume}_{\text{NaOH}} \times \text{Título}_{\text{NaOH}} \times 100 \times 250}{\text{massa}_{\text{toma}} \times \text{Volume}_{\text{filtrado}}} \quad (24)$$

Sendo  $\text{Volume}_{\text{filtrado}}$  o volume da toma para análise pipetado, expresso em mililitros e  $\text{Volume}_{\text{NaOH}}$  o volume da solução de hidróxido de sódio, expresso em mililitros, gasto na determinação.

A acidez pode ser expressa, convencionalmente, em gramas dos seguintes ácidos orgânicos: ácido cítrico anidro, ácido cítrico monoidratado, ácido málico, ácido tartárico, por 100 cm<sup>3</sup> ou por 100 g de produto, multiplicando pelos respetivos fatores.

#### 4.2.8. Matrizes

Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados:

Azeitona

Cogumelos

Marmelada

Limão

Polpa de tomate

Bebidas não alcoólicas

Néctar (*BIPEA* 2015)

Refrigerante Limão

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Determinação Teor de Fósforo Total

Não foram considerados os resultados de duas matrizes (cogumelos em conserva e feijão em conserva) para a validação deste método analítico, por apresentarem um teor de fósforo total menor que o limite de quantificação do método.

#### 5.1.1. Precisão

A precisão do método de ensaio foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

##### 5.1.1.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através da leitura, de oito replicados para cada uma das matrizes analisadas para este método, em condições de repetibilidade, feitas pela mesma analista, no mesmo laboratório, no mesmo equipamento e num curto espaço de tempo (no mesmo dia). As matrizes estudadas foram divididas por gamas,  $<0,50$  g/100 g e  $>0,50$  g/100 g, devido à grande diferença entre os teores de menor concentração e os de maior concentração, que iria influenciar os testes estatísticos.

Os resultados obtidos para a gama menor que 0,50 g/100 g e os parâmetros calculados, média, desvio padrão de repetibilidade, limite de repetibilidade ( $r$ ) e coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Estudo da repetibilidade, para concentrações de fósforo menores que 0,50 g/100 g

Matriz	Teste de Repetibilidade (g/100g)								Média (g/100g)	Variância (g/100g)	Desvio- padrão	CV, %	r (g/100g)	r relativo (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8						
BIPEA - Spread	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	9,00E-06	0,0030	1,99	0,0083	5,57
Chocolate com frutos secos	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	-	0,24	6,00E-06	0,0024	1,01	0,0067	2,81
Achocolatado	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,18	0,17	4,00E-06	0,0019	1,11	0,0054	3,10
BIPEA - Ready- made dish	0,14	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	4,00E-06	0,0019	1,33	0,0053	3,73
BIPEA - Cordon bleu	0,16	0,16	0,17	0,17	0,16	0,16	0,17	0,16	0,17	1,30E-05	0,0036	2,18	0,0101	6,11
BIPEA - Dietary biscuit	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	4,00E-06	0,0019	0,74	0,0054	2,07
Farinha não láctea	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	2,00E-06	0,0015	1,12	0,0043	3,13
Arroz	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	4,00E-06	0,0020	1,93	0,0055	5,41
BIPEA - Cereals	0,19	0,20	0,19	0,19	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	7,00E-06	0,0027	1,39	0,0076	3,89
Farinha de trigo	0,44	0,44	0,44	0,43	0,43	0,44	0,43	0,44	0,44	3,00E-06	0,0017	0,39	0,0047	1,08
Feijão preto	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	3,00E-06	0,0018	0,39	0,0051	1,08
Amêndoa	0,50	0,50	0,49	0,49	0,49	0,49	0,50	0,49	0,49	1,60E-05	0,0040	0,80	0,0111	2,24
Sementes de girassol	0,49	0,49	0,50	0,49	0,50	0,49	0,50	0,49	0,49	4,00E-06	0,0020	0,40	0,0055	1,12

O coeficiente de variação para as matrizes analisadas tem valores entre 0,39 e 2,18%, o limite de repetibilidade varia entre 0,0043 e 0,0111 g/100 g e o limite de repetibilidade relativo apresenta valores entre 1,08% e 6,11%.

Tabela 4 - Teste de Grubbs, para concentrações de fósforo menores que 0,50 g/ 100g

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	G <sub>P</sub> valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G <sub>P</sub> valor máximo	Teste ao valor máximo
BIPEA - Spread	8	2,274	0,15	1,470	Aceitável	0,16	1,915	Aceitável
Chocolate com frutos secos	8	2,274	0,24	0,783	Aceitável	0,26	2,379	Alerta
Achocolatado	8	2,274	0,17	1,247	Aceitável	0,18	1,905	Aceitável
BIPEA - Ready-made dish	8	2,274	0,14	1,446	Aceitável	0,15	1,404	Aceitável
BIPEA - Cordon bleu	8	2,274	0,16	1,092	Aceitável	0,17	1,574	Aceitável
BIPEA - Dietary biscuit	8	2,274	0,26	1,930	Aceitável	0,26	1,527	Aceitável
Farinha não láctea	8	2,274	0,14	1,163	Aceitável	0,14	2,031	Aceitável
Arroz	8	2,274	0,10	1,506	Aceitável	0,10	1,111	Aceitável
BIPEA - Cereals	8	2,274	0,19	1,165	Aceitável	0,20	1,645	Aceitável
Farinha de trigo	8	2,274	0,43	0,960	Aceitável	0,44	1,644	Aceitável
Feijão preto	8	2,274	0,47	1,394	Aceitável	0,47	1,636	Aceitável
Amêndoa	8	2,274	0,49	1,369	Aceitável	0,50	1,556	Aceitável
Sementes de girassol	8	2,274	0,49	1,350	Aceitável	0,50	1,556	Aceitável

A análise aos valores mínimos não indicou a existência de valores discrepantes, no entanto o teste aos valores máximos apresentou um valor inconsistente para a matriz chocolate com frutos secos. O valor máximo da matriz indicada foi então removido e após realização de um novo teste, deixaram de haver valores discrepantes.

Tabela 5 – Teste de Grubbs para a matriz chocolate com frutos secos, após remoção de “outlier”.

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	G <sub>P</sub> Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G <sub>P</sub> valor máximo	Teste ao valor máximo
Chocolate com frutos secos	7	2,139	0,24	1,491	Aceitável	0,24	1,572	Aceitável

De forma a avaliar a homogeneidade de variâncias das matrizes, realizou-se o teste C de Cochran (2.1.3.4 Teste de Cochran), os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Teste de Cochran, para concentrações de fósforo menores que 0,50 g/ 100g

Nº de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor Crítico tabelado Cc(5%)	Avaliação	Conclusão
14	2,9E-04	0,7880	0,1736	Rejeitar a maior variância	Eliminar a maior variância e repetir o teste
Nº de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor Crítico tabelado Cc(5%)	Avaliação	Conclusão
13	1,6E-05	0,2030	0,2098	Ccalc<Ctab5%	valor aceite
Valor do limite da repetibilidade (g/100g)					0,0066
Valor do limite de repetibilidade relativo (%)					3,18

Tabela 7 – Matriz eliminada após a realização do teste de Cochran

Matriz	Teste de Repetibilidade							
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
Aveia	0,51	0,49	0,48	0,46	0,49	0,46	0,46	0,48

O limite da repetibilidade do método, valor calculado, é de 0,0066 g/100 g. O limite da repetibilidade relativo, valor calculado é de 3,18%. O limite da repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de uma mesma amostra realizados em condições de repetibilidade com uma probabilidade normalmente de 95%.

Após a realização do teste de Cochran, foi eliminada a matriz, aveia (Tabela 7), de maior variância, uma vez que após o cálculo do teste o parâmetro  $C_{\text{calculado}}$  é superior que o  $C_{\text{tabelado}}$  (valor crítico tabelado) a 5%.

Os resultados de repetibilidade para as matrizes na gama superior a 0,50 g/100 g e os parâmetros, média, desvio padrão de repetibilidade, limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Estudo da repetibilidade, para concentrações de fósforo maiores que 0,50 g/ 100g

Matriz	Teste de Repetibilidade (g/100g)								Média (g/100g)	Variância (g/100g)	Desvio- padrão	CV <sub>r</sub> %	r (g/100g)	r relativo (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8						
BIPEA - Dietary supplement	3,50	3,49	3,48	3,52	3,51	3,49	3,49	3,47	3,49	2,21E-04	0,015	0,43	0,042	1,19
Caju	0,50	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	5,60E-05	0,0075	1,45	0,021	4,06
Sementes de chia	0,83	0,83	0,81	0,84	0,85	0,83	0,84	0,83	0,83	1,14E-04	0,011	1,28	0,030	3,60
Linhaça	0,61	0,62	0,63	0,61	0,64	0,60	0,61	0,61	0,62	1,14E-04	0,011	1,73	0,030	4,85

O coeficiente de variação da repetibilidade para as quatro matrizes analisadas apresenta valores entre 0,43 e 1,73%, o limite de repetibilidade varia entre 0,021 e 0,042 g/100 g e o limite de repetibilidade relativo está entre 1,19 e 4,85%.

À semelhança das matrizes anteriormente avaliadas, realizou-se o teste de Grubbs, com o propósito de verificar a existência de valores discrepantes. Na Tabela 9 estão os resultados obtidos para o teste de Grubbs das quatro matrizes.

Tabela 9 – Teste de Grubbs para concentrações de fósforo maiores que 0,50 g/ 100g

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	G <sub>p</sub> Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G <sub>p</sub> valor máximo	Teste ao valor máximo
BIPEA - Dietary supplement	8	2,274	3,47	1,348	Aceitável	3,52	1,615	Aceitável
Caju	8	2,274	0,50	1,886	Aceitável	0,52	1,250	Aceitável
Sementes de chia	8	2,274	0,81	1,800	Aceitável	0,85	1,207	Aceitável
Linhaça	8	2,274	0,60	1,341	Aceitável	0,64	1,712	Aceitável

A análise aos valores mínimos e máximos não indica a existência de valores discrepantes para as quatro matrizes analisadas, visto que o valor calculado de G é inferior ao valor crítico para um nível de significância a 1%.

Tabela 10 – Teste de Cochran para concentrações de fósforo maiores que 0,50 g/ 100g

Nº de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor Crítico tabelado Cc(5%)	Avaliação	Conclusão
4	0,0002	0,396	0,502	C <sub>calc</sub> <C <sub>tab</sub> 5%	valor aceite
Valor do limite da repetibilidade (ml/100g)					0,031
Valor do limite da repetibilidade relativo (%)					2,95

O valor calculado para limite de repetibilidade do método analítico é de 0,031 g/100 g. O limite da repetibilidade relativo, valor calculado é 2,95%.

O teste de Cochran não apresentou diferenças significativas nas variâncias, visto que o C<sub>calculado</sub> é inferior ao valor crítico tabelado a 1%.



### 5.1.1.2. Precisão intermédia

O estudo da precisão intermédia incluiu a análise das mesmas matrizes usadas nos ensaios de repetibilidade. Realizaram-se uma série de cinco medições em duplicado, em condições de precisão intermédia, executadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, em dias diferentes. Entre a Tabela 11 e a Tabela 28 estão presentes os resultados, assim como os parâmetros calculados: desvio padrão da precisão intermédia, limite de precisão intermédia e coeficiente de variação da precisão intermédia.

Tabela 11 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz *BIPEA - spread*

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
<i>Spread</i>	0,15	0,15	0,01	7,8E-05	0,15
	0,15	0,15	0,00	3,3E-06	0,15
	0,15	0,15	0,00	6,3E-07	0,15
	0,15	0,15	0,00	6,1E-07	0,15
	0,15	0,14	0,01	5,5E-05	0,15
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math> (g/100g)</b>					0,0037
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					7,0%
<b>Coeficiente de variação</b>					2,5%

O limite de precisão de precisão intermédia para a matriz *BIPEA - spread*, é de 7,0% e o coeficiente de variação de precisão intermédia é de 2,5%, ambos são superiores aos parâmetros obtidos em condições de repetibilidade, o que seria de esperar uma vez que houve alteração do fator tempo nas medições.

Tabela 12 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz *achocolatado*

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
<i>Achocolatado</i>	0,18	0,18	0,00	1,2E-05	0,18
	0,18	0,18	0,00	6,7E-08	0,18
	0,18	0,17	0,01	6,2E-05	0,18
	0,18	0,18	-0,01	2,6E-05	0,18
	0,17	0,17	0,00	9,6E-09	0,17
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math> (g/100g)</b>					0,0032
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					5,0%
<b>Coeficiente de variação</b>					1,8%

Na matriz achocolatado obteve-se um limite de precisão intermédia de 5,0% e um coeficiente de variação de 1,8%. À semelhança da matriz anterior, os parâmetros são superiores ao limite de repetibilidade e respetivo coeficiente de variação.

Tabela 13 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz *BIPEA - dietary biscuit*

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
<i>Dietary Biscuit</i>	0,27	0,26	0,00	2,4E-05	0,27
	0,26	0,26	0,00	7,4E-06	0,26
	0,26	0,26	0,00	1,1E-07	0,26
	0,27	0,26	0,00	7,9E-06	0,27
	0,26	0,26	0,00	9,7E-06	0,26
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math> (g/100g)</b>					0,0022
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					2,4%
<b>Coeficiente de variação</b>					0,8%

No caso da matriz *BIPEA - dietary biscuit*, o limite de precisão intermédia é de 2,4% e o seu coeficiente de variação é de 0,8%, sendo superiores aos parâmetros em condições de repetibilidade.

Tabela 14 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz *BIPEA - cereals*

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
<i>Cereals</i>	0,21	0,18	0,03	6,4E-04	0,19
	0,19	0,19	0,00	8,5E-07	0,19
	0,19	0,19	0,00	1,7E-07	0,19
	0,19	0,20	-0,01	4,8E-05	0,19
	0,19	0,20	-0,01	7,3E-05	0,20
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math> (g/100g)</b>					0,0087
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					12,6%
<b>Coeficiente de variação</b>					4,5%

O limite de precisão intermédia da matriz *BIPEA - cereals* é de 12,6% e o coeficiente de variação de precisão intermédia é de 4,5%, ambos os valores são superiores aos obtidos no estudo da repetibilidade.

Tabela 15 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz *BIPEA - dietary supplement*

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
<i>Dietary Supplement</i>	3,57	3,46	0,10	1,1E-02	3,51
	3,43	3,37	0,06	3,1E-03	3,40
	3,50	3,46	0,04	1,9E-03	3,48
	3,47	3,46	0,00	2,2E-05	3,46
	3,47	3,48	-0,01	1,7E-04	3,48
<b>População</b>	5				
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, S<sub>i</sub> (g/100g)</b>	0,0403				
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>	3,3%				
<b>Coeficiente de variação</b>	1,2%				

Na matriz *BIPEA - dietary supplement*, obteve-se um limite de precisão intermédia de 3,3% e um valor de coeficiente de variação da precisão intermédia de 1,2%. Neste caso o limite de precisão intermédia é inferior ao limite de repetibilidade, o que não seria esperado. Esta matriz após preparação, continuava a apresentar alguma heterogeneidade o que causou alguns problemas nos ensaios, podendo estar relacionado com os resultados obtidos.

Tabela 16 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz feijão preto

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Feijão preto	0,47	0,46	0,00	1,7E-05	0,47
	0,47	0,47	0,00	1,3E-05	0,47
	0,48	0,47	0,01	6,4E-05	0,47
	0,48	0,47	0,01	5,2E-05	0,48
	0,47	0,47	0,00	2,7E-07	0,47
<b>População</b>	5				
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, S<sub>i</sub> (g/100g)</b>	0,0038				
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>	2,3%				
<b>Coeficiente de variação</b>	0,8%				

O limite de precisão intermédia para a matriz feijão preto é de 2,3% e o coeficiente de variação de precisão intermédia é de 0,8%. Uma vez mais o limite e o coeficiente de variação de precisão intermédia apresentam valores mais altos em relação aos parâmetros equivalentes de repetibilidade.

Tabela 17 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz sementes de girassol

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Sementes de girassol	0,50	0,50	0,00	3,0E-07	0,50
	0,50	0,50	0,01	3,6E-05	0,50
	0,49	0,43	0,06	3,4E-03	0,46
	0,49	0,49	0,00	1,5E-06	0,49
	0,49	0,48	0,00	4,2E-06	0,48
População					5
Desvio padrão da precisão intermédia, $S_i$ (g/100g)					0,0187
Limite de precisão intermédia (g/100g)					10,8%
Coeficiente de variação					3,8%

Na matriz sementes de girassol, verifica-se que o limite de precisão intermédia é de 10,8% e o coeficiente de variação de precisão intermédia é 3,8%, ambos apresentam valores mais altos que os resultantes do estudo de repetibilidade, o que está de acordo com o esperado.

Tabela 18 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz farinha de trigo

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Farinha de trigo	0,44	0,44	0,00	1,2E-06	0,44
	0,44	0,44	0,00	1,4E-05	0,44
	0,43	0,43	0,00	5,7E-08	0,43
	0,49	0,49	0,00	1,5E-06	0,49
	0,49	0,48	0,00	4,2E-06	0,48
População					5
Desvio padrão da precisão intermédia, $S_i$ (g/100g)					0,0014
Limite de precisão intermédia (g/100g)					0,9%
Coeficiente de variação					0,3%

Verifica-se que no caso da matriz farinha de trigo, o limite de precisão intermédia é de 0,9% e o coeficiente de variação da precisão intermédia é de 0,3%. O limite de precisão intermédia é inferior ao valor obtido da repetibilidade, o coeficiente de variação é ligeiramente superior ao parâmetro de repetibilidade correspondente.

Tabela 19 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz linhaça

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Linhaça	0,62	0,62	0,01	5,8E-05	0,62
	0,62	0,62	0,00	1,6E-05	0,62
	0,61	0,62	0,00	1,9E-05	0,61
	0,62	0,61	0,00	2,7E-06	0,62
	0,62	0,61	0,01	1,5E-04	0,61
População					5
Desvio padrão da precisão intermédia, S <sub>i</sub> (g/100g)					0,0050
Limite de precisão intermédia (g/100g)					2,3%
Coeficiente de variação					0,8%

A matriz linhaça apresenta um limite de precisão intermédia de 2,3% e um coeficiente de variação de 0,8%. Ambos são superiores ao limite de repetibilidade e coeficiente de variação de repetibilidade.

Tabela 20 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz caju

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Caju	0,52	0,52	0,00	3,3E-06	0,52
	0,53	0,52	0,01	5,1E-05	0,52
	0,52	0,52	0,00	4,9E-07	0,52
	0,53	0,52	0,01	6,7E-05	0,53
	0,53	0,52	0,00	1,4E-05	0,52
População					5
Desvio padrão da precisão intermédia, S <sub>i</sub> (g/100g)					0,0037
Limite de precisão intermédia (g/100g)					2,0%
Coeficiente de variação					0,7%

É possível verificar que para a matriz caju, o limite de precisão intermédia tem um valor de 2,0%, valor semelhante ao limite de repetibilidade e o coeficiente de variação de precisão intermédia é de 0,7%.

Tabela 21 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz arroz

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Arroz	0,10	0,10	0,00	8,7E-07	0,10
	0,10	0,10	0,00	1,1E-05	0,10
	0,10	0,11	0,00	1,5E-06	0,11
	0,10	0,11	0,00	1,1E-05	0,10
	0,10	0,10	0,00	2,2E-07	0,10
População					5
Desvio padrão da precisão intermédia, S <sub>i</sub> (g/100g)					0,0016
Limite de precisão intermédia (g/100g)					4,4%
Coeficiente de variação					1,6%

A matriz arroz tem um limite de precisão intermédia de 4,4% e um coeficiente de variação de 1,6%. O parâmetro limite de precisão intermédia é consideravelmente superior ao parâmetro obtido na repetibilidade.

Tabela 22 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz farinha não láctea

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Farinha não láctea	0,14	0,14	0,00	4,1E-08	0,14
	0,14	0,14	0,00	1,9E-07	0,14
	0,14	0,14	0,00	2,3E-07	0,14
	0,14	0,14	0,00	1,6E-06	0,14
	0,14	0,14	0,00	2,7E-06	0,14
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, S<sub>i</sub> (g/100g)</b>					0,0007
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					1,4%
<b>Coeficiente de variação</b>					0,5%

No estudo da matriz farinha não láctea, obteve-se um limite de precisão intermédia de 1,4% e um coeficiente de variação de 0,5%. À semelhança do verificado anteriormente, o valor do limite de precisão intermédia é superior ao limite de repetibilidade.

Tabela 23 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz BIPEA - cordon bleu

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Cordon bleu	0,17	0,16	0,01	5,6E-05	0,16
	0,16	0,16	0,00	1,0E-08	0,16
	0,16	0,17	0,00	1,0E-05	0,17
	0,17	0,16	0,00	1,0E-05	0,17
	0,16	0,16	0,00	2,6E-06	0,16
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, S<sub>i</sub> (g/100g)</b>					0,0028
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					4,8%
<b>Coeficiente de variação</b>					1,7%

Observa-se que para a matriz BIPEA – cordon bleu, o limite de precisão intermédia é de 4,8% enquanto o coeficiente de variação é de 1,7% e que o primeiro possui um valor mais alto que o limite de repetibilidade.

Tabela 24 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz *BIPEA - ready-made dish with meat*

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
<i>Ready-made dish with meat</i>	0,13	0,13	0,00	1,0E-06	0,13
	0,14	0,14	0,00	1,5E-05	0,14
	0,14	0,14	0,00	5,8E-06	0,14
	0,14	0,14	0,00	1,3E-06	0,14
	0,13	0,14	-0,01	1,5E-04	0,14
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, S<sub>i</sub> (g/100g)</b>					0,0041
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					8,4%
<b>Coeficiente de variação</b>					3,0%

No caso da matriz *BIPEA - ready-made dish with meat*, o limite de precisão intermédia obtido é de 8,4% e o coeficiente de variação é de 3,0%. Aqui verifica-se novamente que os valores obtidos são maiores que o limite de repetibilidade e respetivo coeficiente de variação.

Tabela 25 – Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz amêndoa

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Amêndoa	0,49	0,50	0,00	6,0E-06	0,49
	0,49	0,49	0,00	3,2E-09	0,49
	0,50	0,49	0,00	4,5E-06	0,49
	0,49	0,49	0,00	7,8E-06	0,49
	0,49	0,49	0,00	1,6E-05	0,49
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, S<sub>i</sub> (g/100g)</b>					0,0019
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					1,1%
<b>Coeficiente de variação</b>					0,4%

Para a matriz amêndoa, tem-se um valor de limite de precisão intermédia de 1,1% e um valor de coeficiente de variação de 0,4%. Observa-se que se obteve um valor semelhante para o limite de repetibilidade.

Tabela 26 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz chocolate com frutos secos

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Chocolate com frutos secos	0,24	0,24	0,00	7,8E-07	0,24
	0,24	0,24	0,00	6,8E-06	0,24
	0,24	0,24	0,00	9,4E-07	0,24
	0,24	0,24	0,00	4,0E-07	0,24
	0,24	0,26	-0,01	1,6E-04	0,25
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math> (g/100g)</b>					0,0041
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					4,8%
<b>Coeficiente de variação</b>					1,7%

A matriz chocolate com frutos secos apresenta um limite de precisão intermédia de 4,8% e um coeficiente de variação de precisão intermédia de 1,7%. Verifica-se que o limite de precisão intermédia e o coeficiente de variação são maiores que os parâmetros obtidos em condições de repetibilidade.

Tabela 27 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a matriz sementes de chia

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Sementes de chia	0,83	0,83	0,00	1,8E-06	0,83
	0,81	0,82	-0,01	7,7E-05	0,82
	0,84	0,84	0,00	1,5E-05	0,84
	0,82	0,82	0,00	1,3E-05	0,82
	0,86	0,84	0,02	2,8E-04	0,85
<b>População</b>					5
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math> (g/100g)</b>					0,0062
<b>Limite de precisão intermédia (g/100g)</b>					2,1%
<b>Coeficiente de variação</b>					0,8%

O limite de precisão intermédia para a matriz sementes de chia é de 2,1% e o coeficiente de variação é de 0,8%, ambos são ligeiramente inferiores aos parâmetros de repetibilidade.

Tabela 28 – Parâmetros de precisão intermédia do método

<b>População</b>	85
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math></b>	0,011
<b>Limite de precisão intermédia, <math>r_i</math></b>	6,1%
<b>Coeficiente de variação</b>	2,2%



Ao fazer uma análise de todas as matrizes (Tabela 28), obteve-se um limite de precisão intermédia de 6,1% para o método analítico e um coeficiente de variação de precisão intermédia de 2,2%. A Siliker considera que a diferença entre os resultados de duas medições realizadas em condições de precisão intermédia não deve exceder os 10% do valor médio, o que está de acordo com o obtido.

### 5.1.2. Exatidão

Como foi referido anteriormente, a exatidão de um método é a concordância entre o resultado obtido a partir do método de ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. A exatidão do método foi avaliada com base nos resultados obtidos para os materiais de referência certificados (MRC), por comparação do valor obtido nas medições e o valor e o limite superior e inferior certificados. Os valores obtidos estão na Tabela 29.

Tabela 29 - Avaliação da exatidão do método

MRC	Valor medido (mg/100 g)	Valor certificado (mg/100 g)	Limite inferior (mg/100 g)	Limite superior (mg/100 g)	Avaliação da exatidão
<i>Spread</i>	149,7	148	133	163	OK
<i>Ready-made dish with meat</i>	142,7	135	121	149	OK
<i>Corden bleu</i>	165,9	158	142	174	OK
<i>Dietary biscuit</i>	260,2	269	242	296	OK
<i>Dietary supplement</i>	3472	3495	3145	3845	OK
<i>Cereals</i>	196,4	191,1	172	210	OK

Obtiveram-se valores medidos compreendidos entre 142,7 e 3472 mg/100g para os materiais de referência certificados estudados. Em comparação com os valores referenciados, pode afirmar-se que todos os MRC apresentam uma boa exatidão, visto que os valores medidos estão dentro dos limites definidos pela entidade de referência.

### 5.1.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação teórico é obtido através da expressão dos resultados para o teor de fósforo total na amostra,  $C_P$ .

$$C_P = \frac{c \times 500 \times f \times 100}{m \times 10^6} = \frac{c \times 5 \times f}{m \times 100}$$

Nesta equação o teor de fósforo na solução da amostra obtido a partir da curva de calibração,  $c$ , é a menor concentração permitida pelo método, 2,5 ug/100 g, que vai corresponder ao menor ponto da curva de calibração; o fator de diluição é igual a 1; e a massa da toma é a única permitida pelo método de 2,5 g. Daqui obtém-se um limite de quantificação para o método de 0,05 g/100 g.

#### 5.1.4. Linearidade

O método é linear entre 0,05 g/100g e 4,0 g/100 g, como descrito na norma anterior.

#### 5.1.5. Gama de trabalho

A gama de trabalho está compreendida entre 0,05 g/100 g e 4,00 g/100 g, sendo definida pelo valor do limite de quantificação, até 5 a 10% do valor mais alto da repetibilidade (matriz com maior valor nos 8 ensaios).

#### 5.1.6. Incerteza

A incerteza associada ao método foi calculada através dos resultados obtidos de materiais de referência certificados, pela componente aleatória de precisão intermédia e pela componente sistemática de exatidão. Obteve-se um valor de incerteza combinada de 6% e um valor de incerteza relativa estimada de 12%, para um intervalo de confiança de 95% (Tabela 31). A incerteza expandida foi estimada considerando como fator de cobertura  $k = 2$ .

Tabela 30 – Componente da precisão intermédia para o cálculo de incerteza

Precisão Intermédia (PI)	
<b>Desvio da precisão intermédia</b>	0,0114
<b>Média dos ensaios</b>	0,524
<b>Número de ensaios</b>	85
<b>Componente da PI (%rsd)</b>	2,176

Tabela 31 – Valor de incerteza expandida estimada

MRC	Valor medido (mg/100g)	Valor certificado (mg/100g)	Incerteza certificado	Incerteza combinada	Incerteza expandida
<i>Spread</i>	149,7	148,0	9	5,9	11,8
<i>Ready-made dish with meat</i>	142,7	135,0	1		
<i>Corden bleu</i>	165,9	158,0	5		
<i>Dietary biscuits</i>	260	269,0	20		
<i>Dietary supplement</i>	3493	3495	170		
<i>Cereals</i>	196,4	191,0	5		

A incerteza expandida corresponde à incerteza do método de ensaio e esta define um intervalo de incerteza sobre o resultado da medição.

#### 5.1.7. Apresentação dos resultados

Os resultados de teor de fósforo total apresentam-se em arredondados às centésimas (g/100g), como definido na norma anterior.

## 5.2. Determinação de Acidez

### 5.2.1. Precisão

A precisão do método de ensaio foi estudada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

#### 5.2.1.1. Repetibilidade

O estudo da repetibilidade do método envolveu a realização de uma série de quatro replicados para cada uma das matrizes analisadas para este método, em condições de repetibilidade, ou seja, executado pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, no mesmo equipamento e num curto espaço de tempo (no mesmo dia).

Os resultados obtidos para as matrizes estudadas e os parâmetros calculados, média, desvio padrão de repetibilidade, coeficiente de variação de repetibilidade (CV<sub>r</sub>) e limite de repetibilidade (r) encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32 – Parâmetros de repetibilidade para a acidez determinada em ml/100g.

Matriz	Teste de Repetibilidade (ml/100g)				Média (ml/100g)	Variância (ml/100g)	Desvio- padrão	CV <sub>r</sub> %	r (ml/100g)	r relativo (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4						
Azeitona	7,3	7,5	7,5	7,6	7,5	0,010	0,10	1,35	0,28	3,8
Refrigerante de limão	3,2	3,3	3,2	3,3	3,3	0,001	0,04	1,18	0,11	3,3
Néctar	7,5	7,3	7,5	7,4	7,4	0,006	0,07	1,00	0,21	2,8
Cogumelos	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	0,003	0,06	4,15	0,16	11,6
Limão	75,4	75,2	75,3	-	75,3	0,007	0,08	0,11	0,24	0,3
Marmelada	10,6	10,9	10,7	10,9	10,7	0,025	0,16	1,47	0,44	4,1
Polpa de tomate	8,2	8,2	8,3	8,3	8,2	0,002	0,04	0,54	0,12	1,5
Polpa de tomate	14,7	14,6	14,7	14,8	14,7	0,010	0,10	0,70	0,29	1,9

O coeficiente de variação para as matrizes analisadas toma valores entre 0,11 e 4,15%, o limite de repetibilidade varia entre 0,11 e 0,44 ml/100 g e o limite de repetibilidade relativo apresenta valores entre 0,3% e 11,6%.

De forma de detetar a presença de valores discrepantes ou “outliers”, realizou-se o teste de Grubbs, que faz uma avaliação do valor mínimo e máximo obtido para cada amostra. Na Tabela 33 estão os resultados obtidos para o teste de Grubbs das amostras em análise.

Tabela 33 – Teste de Grubbs para a determinação de acidez.

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	G <sub>P</sub> valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G <sub>P</sub> valor máximo	Teste ao valor máximo
Azeitona	4	1,496	7,3	1,391	Aceitável	7,6	0,994	Aceitável
Refrigerante de limão	4	1,496	3,2	0,786	Aceitável	3,3	1,313	Aceitável
Néctar	4	1,496	7,3	1,096	Aceitável	7,5	1,101	Aceitável
Cogumelos	4	1,496	1,3	1,411	Aceitável	1,4	0,710	Aceitável
Limão	4	1,496	75,2	0,508	Aceitável	94,2	1,500	Alerta
Marmelada	4	1,496	10,6	1,023	Aceitável	10,9	1,139	Aceitável
Polpa de tomate	4	1,496	8,2	0,901	Aceitável	8,3	0,938	Aceitável
Polpa de tomate	4	1,496	14,6	1,010	Aceitável	14,8	1,382	Aceitável

A análise aos valores mínimos não indicou a existência de valores discrepantes, no entanto o teste aos valores máximos apresentou um valor inconsistente para a matriz limão. O valor máximo da matriz foi removido e após realização de um novo teste, deixaram de haver valores discrepantes.

Tabela 34 - Teste de Grubbs para a matriz limão, após remoção de “outlier”.

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	G <sub>P</sub> valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G <sub>P</sub> valor máximo	Teste ao valor máximo
Limão	3	1,155	75,2	0,937	Aceitável	75,4	1,053	Aceitável

A fim de avaliar a homogeneidade de variâncias das matrizes, realizou-se o teste C de Cochran, os resultados encontram-se na Tabela 35.

Tabela 35 – Teste de Cochran para a determinação de acidez.

Nº de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor Crítico tabelado $C_c(5\%)$	Avaliação	Conclusão
8	0,02	0,386	0,438	$C_{calc} < C_{tab5\%}$	valor aceite
Valor do limite da repetibilidade (ml/100g)					0,23
Valor do limite de repetibilidade relativo (%)					3,67

O limite da repetibilidade calculado, é de 0,23 ml/100 g. O limite da repetibilidade relativo obtido é de 3,67%. Como referido anteriormente o limite da repetibilidade representa o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de uma mesma amostra realizados em condições de repetibilidade com uma probabilidade normalmente de 95%.

O teste de Cochran não apresentou diferenças significativas nas variâncias, uma vez que o  $C_{calculado}$  é inferior ao valor crítico tabelado a 1%.

De forma a validar a titulação potenciométrica, realizou-se a determinação de acidez na matriz polpa de tomate I de três formas distintas, por titulação com indicador, por titulação potenciométrica por interpolação e por titulação potenciométrica com leitura direta a pH de 8,1. Os resultados das três leituras encontram-se entre a Tabela 36 e Tabela 38.

Tabela 36 – Determinação da acidez por titulação com indicador e por titulação potenciométrica da matriz polpa de tomate

Titulação	Matriz	Teste de Repetibilidade (ml/100g)				Média (ml/100g)	Variância (ml/100g)	Desvio- padrão	CV <sub>r</sub> %	r (ml/100g)	r relativo (%)
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4						
Indicador	Polpa de tomate	8,2	8,2	8,3	8,3	8,2	0,002	0,04	0,54	0,12	1,51
Potenciométrica		8,2	8,1	8,1	8,2	8,2	0,002	0,04	0,55	0,12	1,53
Leitura direta		8,3	8,1	8,2	8,3	8,2	0,006	0,08	0,93	0,21	2,60

Tabela 37 – Teste de Grubbs

Titulação	Matriz	Teste de Grubbs							
		População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	G <sub>P</sub> valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G <sub>P</sub> valor máximo	Teste ao valor máximo
Indicador	Polpa de tomate	4	1,496	8,2	0,901	Aceitável	8,3	0,938	Aceitável
Potenciométrica		4	1,496	8,1	1,084	Aceitável	8,2	1,095	Aceitável
Leitura direta		4	1,496	8,1	1,312	Aceitável	8,3	0,836	Aceitável

Tabela 38 – Teste de Cochran

Nº de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor Crítico tabelado Cc(5%)	Avaliação	Conclusão
3	0,006	0,597	0,798	Ccalc<Ctab5%	valor aceite
Valor do limite da repetibilidade (ml/100g)					0,15
Valor do limite de repetibilidade relativo (CV <sub>r</sub> %)					1,88

O teste de Grubbs (Tabela 37) aos valores máximos e mínimos não apresenta valores discrepantes, todos os valores mínimos e máximos são aceitáveis, visto que o valor de  $G_P$  calculado é inferior ao valor tabelado a 1%.

O teste de Cochran (Tabela 38) à homogeneidade das variâncias não apresentou diferenças significativas nas variâncias, uma vez que o  $C_{\text{calculado}}$  é inferior ao valor crítico tabelado a 1%.

#### 5.2.1.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi demonstrada através da análise de várias matrizes em condições de precisão intermédia, executadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, em dias diferentes. Realizou-se para cada matriz um ensaio em duplicado

Na Tabela 39 e Tabela 40 estão presentes os resultados, assim como os parâmetros calculados: desvio padrão da precisão intermédia, limite de precisão intermédia e coeficiente de variação da precisão intermédia.

Tabela 39 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão intermédia para a determinação de acidez

Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) <sup>2</sup>	Média
Ice tea chá preto c/ frutos vermelhos	2,7	2,6	0,0	0,0	2,7
Laranja	10,6	10,8	-0,2	0,0	10,7
Ice tea limão	4,4	4,4	0,0	0,0	4,4
Refrigerante com gás	2,4	2,5	-0,1	0,0	2,5
Refrigerante sem gás	6,0	6,0	-0,1	0,0	6,0
Refrigerante <i>Activa Drink</i>	5,8	5,8	0,0	0,0	5,8
Leguminosas em conserva	2,6	2,5	0,1	0,0	2,6
Néctar	9,7	9,7	0,0	0,0	9,7
Refrigerante com gás	10,4	10,4	0,0	0,0	10,4
Azeitona Verde	8,2	8,2	0,0	0,0	8,2
Refrigerante sem gás	2,5	2,6	-0,1	0,0	2,5
Sumo	11,8	11,9	-0,1	0,0	11,8
Azeitona	7,1	7,2	0,0	0,0	7,1
Refrigerante sem gás	2,7	2,7	0,0	0,0	2,7
Refrigerante sem gás	2,2	2,3	0,0	0,0	2,3
Azeitona	6,6	6,5	0,1	0,0	6,6
Néctar	5,7	5,7	0,0	0,0	5,7
Refrigerante sem gás	2,9	2,9	0,0	0,0	2,9
Sumo 100%	5,0	4,9	0,1	0,0	5,0
Refrigerante sem gás	3,3	3,3	0,1	0,0	3,3



Refrigerante sem gás	3,7	3,7	0,0	0,0	3,7
Refrigerante com gás	21,2	21,6	-0,4	0,2	21,4
Refrigerante com gás	1,9	2,0	-0,1	0,0	2,0
Polpa Tomate	17,4	16,8	0,6	0,4	17,1
Fruta	27,5	27,1	0,4	0,2	27,3
Marmelada	11,7	12,5	-0,8	0,6	12,1
Refrigerante sem gás	5,6	5,6	0,0	0,0	5,6
Gelatina	5,2	5,0	0,3	0,1	5,1
Refrigerante sem gás	3,4	3,3	0,1	0,0	3,3
Refrigerante com gás	21,7	22,1	-0,4	0,2	21,9
Refrigerante sem gás	5,3	5,5	-0,1	0,0	5,4
Refrigerante sem gás	4,6	4,6	-0,1	0,0	4,6
Refrigerante sem gás	8,1	8,2	-0,1	0,0	8,2
Polpa Tomate	17,0	16,4	0,6	0,4	16,7
Refrigerante sem gás	4,0	3,9	0,0	0,0	3,9
Refrigerante sem gás	5,5	5,6	-0,1	0,0	5,6
Refrigerante com gás	2,5	2,5	0,0	0,0	2,5
Néctar	3,9	3,8	0,1	0,0	3,9
Néctar	10,1	10,1	0,0	0,0	10,1
Refrigerante com gás	6,7	6,7	-0,1	0,0	6,7
Azeitona Verde	11,6	11,6	0,0	0,0	11,6
Nectaríssimo - Maracujá/Maçã/Manga	9,2	9,0	0,1	0,0	9,1
Iced Tea - Manga	2,8	2,8	0,0	0,0	2,8
Refrigerante sem gás - Pêssego	3,0	3,0	0,0	0,0	3,0
Sumo - Manga/Laranja	7,6	7,4	0,3	0,1	7,5
Refrigerante sem gás	3,8	3,8	0,0	0,0	3,8
Cogumelos	1,3	1,4	-0,1	0,0	1,3
Polpa Tomate	12,3	12,4	-0,1	0,0	12,4
Refrigerante sem gás	4,0	4,1	-0,1	0,0	4,1
Refrigerante sem gás	1,3	1,2	0,0	0,0	1,3
Néctar	6,0	5,8	0,2	0,0	5,9
Néctar	3,8	3,9	-0,1	0,0	3,9
Bebida	1,9	1,9	0,0	0,0	1,9
BIPEA - Pineapple juice	8,4	8,5	-0,1	0,0	8,5

Tabela 40 - Parâmetros de precisão intermédia do método de determinação de acidez

<b>População</b>	54
<b>Desvio padrão da precisão intermédia, <math>S_i</math></b>	0,15
<b>Limite de precisão intermédia, <math>r_i</math></b>	5,9%
<b>Coeficiente de variação</b>	2,1%

Através da análise de todas as matrizes, obteve-se um limite de precisão intermédia para o método analítico de 5,9% e um coeficiente de variação de 2,1%. Como referido no método anterior, a Silliker considera que o limite de precisão intermédia não deve exceder os 10%, o que está em conformidade com o valor obtido.

### 5.2.2. Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada com base nos resultados obtidos para os materiais de referência certificados (MRC), através da comparação do valor obtido nos ensaios e o valor certificados assim como os respetivos limites superior e inferior. A avaliação da exatidão encontra-se na Tabela 41.

Tabela 41 – Avaliação da exatidão do método de determinação de acidez

MRC	Valor medido (meq/l)	Valor certificado (meq/l)	Limite inferior (meq/l)	Limite superior (meq/l)	Avaliação da exatidão
<i>Orange syrup</i>	223,1	221,9	213,0	230,8	OK
<i>Prune juice</i>	110,0	107,0	102,7	111,3	OK
<i>Pineapple juice</i>	87,2	88,3	84,8	91,8	OK
<i>Orange juice</i>	104,9	108,9	104,5	113,3	OK
<i>Diluted lemon concentrate</i>	950,9	931,8	894,5	969,1	OK
<i>Spiked orange juice</i>	63,7	63,5	61,0	66,0	OK
<i>Apple-blackcurrant beverage</i>	47,2	49,0	47,0	51,0	OK
<i>Diet soda</i>	51,0	50,7	48,1	53,3	OK
<i>Orange concentrate</i>	100,9	104,5	100,3	108,7	OK
<i>Energy drink</i>	58,6	60,1	57,7	62,5	OK
<i>Grape juice</i>	80,2	79,0	75,8	82,2	OK
<i>Grapefruit juice</i>	176,8	178,6	171,5	185,7	OK
<i>Grenadine syrup</i>	80,2	79,0	75,8	82,2	OK
<i>Orange juice</i>	109,8	111,8	107,3	116,3	OK
<i>Cola</i>	11,6	11,9	9,9	13,9	OK
<i>Grapefruit juice</i>	201,3	202,4	194,3	210,5	OK
<i>Apricot nectar</i>	99,9	102,1	98,0	106,2	OK
<i>Grape fruit</i>	72,2	73,4	70,5	76,3	OK
<i>Prune juice</i>	91,6	91,4	87,7	95,1	OK
<i>Apple juice</i>	72,0	70,0	67,6	72,4	OK
<i>Orange juice (concentrate)</i>	100,0	99,4	95,4	103,4	OK
<i>Apricot nectar</i>	106,0	105,2	101,0	109,4	OK
<i>Grape juice</i>	65,0	64,3	61,7	66,9	OK
<i>Pineapple juice</i>	84,0	86,4	82,9	89,9	OK

### 5.2.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método já tinha sido validado anteriormente, sendo de 0,02ml/100ml.

### 5.2.4. Incerteza

A incerteza associada ao método analítico foi determinada através dos resultados obtidos de materiais de referência certificados, pela componente aleatória de precisão intermédia e pela componente sistemática de exatidão (Tabela 43).

Tabela 42 - Componente da precisão intermédia para o cálculo de incerteza

<b>Precisão Intermédia (PI)</b>	
<b>Desvio da precisão intermédia</b>	0,147
<b>Média dos ensaios</b>	6,976
<b>Número de ensaios</b>	54
<b>Componente da PI (%rsd)</b>	2,106

Observando a Tabela 43 é possível verificar que o valor de incerteza combinada é de 3,0% e o valor de incerteza estimada é de 6,0%, para um intervalo de confiança de 95%. Utilizou-se como fator de cobertura  $k = 2$ . A incerteza expandida corresponde à incerteza do método de ensaio, esta representa o intervalo de incerteza associado a cada medição.

Tabela 43 - Valor de incerteza expandida estimada

MRC	Valor medido	Valor certificado	Incerteza certificado	Incerteza combinada	Incerteza expandida
<i>Orange syrup</i>	223,1	221,9	1	3,006	6,012
<i>Prune juice</i>	110,0	107,0	0,7		
<i>Pineapple juice</i>	87,2	88,3	0,3		
<i>Orange juice</i>	104,9	108,9	0,5		
<i>Diluted lemon concentrate</i>	950,9	931,8	8,1		
<i>Spiked orange juice</i>	63,7	63,5	0,3		
<i>Apple-blackcurrant beverage</i>	47,2	49,0	0,3		
<i>Diet soda</i>	51,0	50,7	0,8		
<i>Orange concentrate</i>	100,9	104,5	0,7		
<i>Energy drink</i>	58,6	60,1	0,6		
<i>Grape juice</i>	80,2	79,0	0,3		
<i>Grapefruit juice</i>	176,8	178,6	0,5		
<i>Grenadine syrup</i>	80,2	79,0	0,3		
<i>Orange juice</i>	109,8	111,8	0,6		
<i>Cola</i>	11,6	11,9	0,3		
<i>Grapefruit juice</i>	201,3	202,4	0,4		
<i>Apricot nectar</i>	99,9	102,1	0,5		
<i>Grape fruit</i>	72,2	73,4	0,4		
<i>Prune juice</i>	91,6	91,4	0,7		
<i>Apple juice</i>	72,0	70,0	0,2		
<i>Orange juice (concentrate)</i>	100,0	99,4	0,6		
<i>Apricot nectar</i>	106,0	105,2	0,4		
<i>Grape juice</i>	65,0	64,3	0,3		
<i>Pineapple juice</i>	84,0	86,4	0,6		

### 5.2.5. Apresentação dos resultados

Os resultados de acidez apresentam-se arredondados às décimas (ml de solução alcalina por 100 ml ou por 100 g de amostra) como definido na norma anterior.

## 6. Conclusões

O presente trabalho teve como fim a validação de uma metodologia analítica para a determinação do teor de fósforo total em amostras de seis grupos alimentares, por espectrofotometria de absorção molecular segundo uma norma existente para alimentos de animais e a revalidação do método de determinação de acidez por titulação para matrizes hortícolas e derivados a partir de uma norma.

O método da determinação do teor de fósforo total foi validado para dezassete das vinte matrizes analisadas, sendo elas: *spread*, chocolate com frutos secos, achocolatado, *ready-made dish with meat*, *cordon bleu*, *dietary biscuit*, farinha não láctea, arroz, *cereals*, farinha de trigo, feijão preto, amêndoa, sementes de girassol, *dietary supplement*, caju, sementes de chia e linhaça.

Na precisão do método a nível da repetibilidade e precisão intermédia pode concluir-se através dos resultados obtidos que é aceitável. Obteve-se um limite de repetibilidade de 0,0066 g/100 g e 0,031 g/100 g para as gamas, <0,50 g/100 g e >0,50 g/100 g respetivamente, este corresponde ao valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios obtidos nas mesmas condições de repetibilidade, com um nível de confiança de 95%. O limite de precisão intermédia calculado é de 6% o que está de acordo com os critérios da empresa.

No estudo da exatidão, a análise de materiais de referência certificados (MRC) permitiu verificar que todos os valores estavam dentro dos limites certificados, de onde se pode concluir que o método de ensaio permite obter resultados com exatidão.

O método de determinação de acidez foi revalidado para as matrizes analisadas: azeitona, refrigerante de limão, néctar, cogumelos, limão, marmelada e polpa de tomate.

A precisão do método analítico foi analisada em termos de repetibilidade e precisão intermédia, podendo-se concluir através dos resultados obtidos que é aceitável. Determinou-se um limite de repetibilidade de 0,23 ml/100 g. Obteve-se um limite de precisão intermédia de 6%, o que está de acordo com os critérios da empresa.

A exatidão do método inclui a análise de materiais de referência certificados permitindo averiguar que os valores estavam dentro dos limites certificados, de onde se pode deduzir que o método de ensaio permite obter resultados exatos.

A análise da matriz polpa de tomate I, por titulação com indicador e por titulação potenciométricas não indicou diferenças significativas entre os métodos de titulação.

Em suma, ambos os métodos de ensaio de análise química foram validados para os grupos alimentares analisados.

## 7. Bibliografia

1. Mérieux Nutrisciences. Silliker Portugal - Merieux Nutrisciences. © Mérieux Nutrisciences Corporation (2017). Disponível em: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/silliker-portugal>. (Consultado a: 1-07-2017)
2. TÜV SÜD. The Importance of Food Safety - The TÜV SÜD Safety Gauge study. *TÜV SÜD Glob. Food Heal. Beauty* (2015).
3. Blaha, T. in *Product safety and quality assurance* (eds. Windhorst, H.-W. & Dijkhuizen, A. A.) 1–5 (2002).
4. Cifuentes, A. Food Analysis: Present, Future, and Foodomics. *ISRN Analytical Chemistry* **2012**, 1–16 (2012).
5. RELACRE. *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Guia 13*. (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).
6. Silliker Portugal. *Manual da Qualidade*. (Silliker Portugal, S.A., 2016).
7. Mérieux Nutrisciences. Silliker Portugal: Os nossos Serviços. © Mérieux Nutrisciences Corporation (2017). Disponível em: <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/servicos/seguranca-e-qualidade-alimentar/os-nossos-servicos>. (Consultado a: 2-07-2017)
8. NP-874. Norma Portuguesa 874 Alimentos para animais. Determinação do teor de fósforo total. Método espectrofotométrico. 7 (2000).
9. NP-1421. Norma Portuguesa 1421 Géneros alimentícios derivados de frutos e produtos hortícolas. Determinação da acidez. 3 (1977).
10. González, A. G. & Herrador, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal. Chem.* **26**, 227–238 (2007).
11. Instituto Português de Acreditação. Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025. *IPAC 21* (2010).
12. PCQ.34. Validação de métodos em análise química. *Silliker Port. S.A.* 34 (2016).
13. ISO 5725-2:1994/Cor.1:2002(EN). *Accuracy (trueness and precision) of*

*measurement methods and results. Part 2: Basic method for determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.* (International Organisation for Standardization, 2002).

14. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry.* (Pearson Education Limited, 2010). doi:10.1198/tech.2004.s248
15. Instituto Português de Acreditação. Avaliação da Incerteza de Medição em Calibração. *IPAC 14* (2015).
16. Institute of Medicine (US) Standing Committee. *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Nutrition Reviews* **55**, (National Academy Press (US), 1997).
17. Caballero, B., Allen, L. H. & Prentice, A. *Encyclopedia of Human Nutrition.* (Elsevier Ltd, 2013).
18. Suki, W. N. & Moore, L. W. Phosphorus Regulation in Chronic Kidney Disease. *Methodist Debaque Cardiovasc J* **12**, 6–9 (2016).
19. Mahan, L. K., Escott-Stump, S. & Raymond, J. L. *Krause's Food and the Nutrition Care Process.* (Elsevier, 2012).
20. Rouessac, F. & Rouessac, A. *Chemical Analysis : Modern Instrumentation Methods and Techniques.* (Wiley, 2007).
21. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry.* (Cengage Learning US, 2013).
22. Rahman, M. S. in *Handbook of Food Preservation* (ed. Rahman, M. S.) 287–298 (CRC Press, 2007).
23. Nielsen, S. S. *Food Analysis Laboratory Manual. The Journal of nutrition* **7**, (Springer Science, 2010).
24. M & M Wine Grape Co. pH , Total Acidity , and Titratable Acid ( TA ) defined. *Juicegrape.com* 1 (2013).



## 8. Anexos

### Anexo A – Valores críticos para os testes de Cochran e Grubbs

Tabela 44 – Valores críticos para o teste de Grubbs.

<b>P</b>	<b>Valor crítico a 1%</b>	<b>Valor crítico a 5%</b>	<b>P</b>	<b>Valor crítico a 1%</b>	<b>Valor crítico a 5%</b>
<b>3</b>	1,155	1,155	<b>22</b>	3,06	2,758
<b>4</b>	1,496	1,481	<b>23</b>	3,087	2,781
<b>5</b>	1,764	1,715	<b>24</b>	3,112	2,802
<b>6</b>	1,973	1,887	<b>25</b>	3,135	2,822
<b>7</b>	2,139	2,02	<b>26</b>	3,157	2,841
<b>8</b>	2,274	2,126	<b>27</b>	3,178	2,859
<b>9</b>	2,387	2,215	<b>28</b>	3,199	2,876
<b>10</b>	2,482	2,29	<b>29</b>	3,218	2,893
<b>11</b>	2,564	2,355	<b>30</b>	3,236	2,908
<b>12</b>	2,636	2,412	<b>31</b>	3,253	2,924
<b>13</b>	2,699	2,462	<b>32</b>	3,27	2,938
<b>14</b>	2,755	2,507	<b>33</b>	3,286	2,952
<b>15</b>	2,806	2,549	<b>34</b>	3,301	2,965
<b>16</b>	2,852	2,585	<b>35</b>	3,316	2,979
<b>17</b>	2,894	2,62	<b>36</b>	3,33	2,991
<b>18</b>	2,932	2,651	<b>37</b>	3,343	3,003
<b>19</b>	2,968	2,681	<b>38</b>	3,356	3,014
<b>20</b>	3,001	2,709	<b>39</b>	3,369	3,025
<b>21</b>	3,031	2,733	<b>40</b>	3,381	3,036

P – Número de replicados num ensaio.

Tabela 45 – Valores críticos para o teste de Cochran

P	n=2		n=3		n=4		n=5		n=6	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2	-	-	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,877
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,793	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,450	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,243
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
31	0,355	0,286	0,235	0,193	0,186	0,155	0,159	0,134	0,141	0,120
32	0,347	0,280	0,229	0,188	0,181	0,151	0,155	0,131	0,138	0,117
33	0,339	0,273	0,224	0,184	0,177	0,147	0,151	0,127	0,134	0,114
34	0,332	0,267	0,218	0,179	0,172	0,144	0,147	0,124	0,131	0,111
35	0,325	0,262	0,213	0,175	0,168	0,140	0,144	0,121	0,127	0,108
36	0,318	0,256	0,208	0,172	0,165	0,137	0,140	0,118	0,124	0,106
37	0,312	0,251	0,204	0,168	0,161	0,134	0,137	0,116	0,121	0,103
38	0,306	0,246	0,200	0,164	0,157	0,131	0,134	0,113	0,119	0,101
39	0,300	0,242	0,196	0,161	0,154	0,129	0,131	0,111	0,116	0,099
40	0,294	0,237	0,192	0,158	0,151	0,126	0,128	0,108	0,114	0,097

## Anexo B – Cálculos e incertezas

### Validação do método de determinação de fósforo

Exemplo com a matriz *Spread*

- Cálculo da variância de repetibilidade

$$S_{ri}^2 = \frac{(n_{wi} - 1) \times S_{wi}^2}{(n_{wi} - 1)} = \frac{7 \times (0,0030)^2}{7} = 9 \times 10^{-6} \text{ g/100g}$$

- Cálculo do limite de repetibilidade

$$r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2} = 2,8 \sqrt{9 \times 10^{-6}} = 0,0083 \text{ g/100g}$$

- Cálculo do limite de repetibilidade relativo

$$r \text{ relativo} = \frac{r}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,0083}{0,150} = 5,57\%$$

- Cálculo do coeficiente de variação

$$CV_r(\%) = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 = \frac{9 \times 10^{-6}}{0,150} \times 100 = 1,99\%$$

- Cálculo do teste de Grubbs

Teste ao valor mínimo

Valor mínimo = 0,145 g/100g

Desvio padrão, S=0,0030

Média dos resultados,  $\bar{x} = 0,150 \text{ g/100g}$

$$G_p = \frac{|x_p - \bar{x}|}{S} = \frac{|0,145 - 0,150|}{0,0030} = 1,470$$

Teste ao valor máximo

Valor máximo = 0,155 g/100 g

$$G_p = \frac{|x_p - \bar{x}|}{S} = \frac{|0,155 - 0,150|}{0,0030} = 1,915$$

- Cálculo do teste de Cochran

Exemplo para as 14 matrizes, gama <0,50 g/100 g

Maior variância,  $s_{\max}^2 = 2,9 \times 10^{-6}$

Somatório de todas as variâncias,  $\sum_{i=1}^p s_i^2 = 3,7 \times 10^{-4}$

$$C \text{ de Cochran}_{\text{calculado}} = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} = \frac{2,9 \times 10^{-6}}{3,7 \times 10^{-4}} = 0,788$$

- Cálculo do desvio padrão de precisão intermédia

População,  $t = 5$

$$\sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2 = 1,37 \times 10^{-4} \text{ g/100 g}$$

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \times \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 5} \times 1,37 \times 10^{-4}} = 0,0037 \text{ g/100 g}$$

- Cálculo do limite de precisão intermédia

Média das médias dos duplicados,  $M=0,148$

$$r_i(\%) = \frac{S_i \times 100 \times 2,8}{M} = \frac{0,0037 \times 100 \times 2,8}{0,148} = 7,0\%$$

### Cálculo da incerteza do método

- Componente da precisão intermédia (desvio padrão relativo da população)

Desvio padrão da população da precisão intermédia,  $R_w = 0,0114$

Média da média dos duplicados,  $\bar{x} = 0,524 \text{ g/100 g}$

$$R_{w,\text{relativo}} = \% \text{rsd} = \frac{R_w \times 100}{\bar{x}} = \frac{0,0114 \times 100}{0,524} = 2,176$$

- Enviesamento amostral (bias)

$$\text{bias}_{\text{relativo}} = \frac{(\text{Valor medido} - \text{Valor certificado})}{\text{Valor certificado}} \times 100$$

- Componente de incerteza para bias (%)

Raiz do valor quadrático do enviesamento amostral,  $\text{RMS}_{\text{bias,relativo}} = 3,607$

Média do valor da incerteza certificado  $\overline{U(C_{\text{ref}})_{\text{relative}}} = 4,151$

$$u(\text{bias})_{\text{relativo}} = \sqrt{\text{RMS}_{\text{bias,relativo}}^2 + \overline{U(C_{\text{ref}})_{\text{relative}}}^2} = \sqrt{3,607^2 + 4,151^2} = 5,499$$

- Incerteza combinada

$$u_{\text{combinada}} = \sqrt{u(R_{w,\text{relativo}})^2 + u(\text{bias})_{\text{relativo}}^2} = \sqrt{2,176^2 + 5,499^2} = 5,913$$

- Incerteza expandida

Fator de cobertura,  $k = 2$

$$U_{\text{expandida}} = k \times u_{\text{combinada}} = 2 \times 5,913 = 11,83$$